



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**MARILIA FERNANDA CHAVES SAMPAIO**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA  
DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS  
AROMÁTICOS EM CARANGUEJO-UÇÁ (*Ucides cordatus*)**

**METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR POLYCYCLIC  
AROMATIC HYDROCARBONS DETERMINATION IN UÇÁ-CRAB  
(*Ucides cordatus*)**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**MARILIA FERNANDA CHAVES SAMPAIO**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA  
DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS  
AROMÁTICOS EM CARANGUEJO-UÇÁ (*Ucides cordatus*)**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Química, da Universidade Federal de  
Sergipe, para a obtenção do título de  
Mestre em Química.

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo da Rosa Alexandre**

**METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR POLYCYCLIC  
AROMATIC HYDROCARBONS DETERMINATION IN UÇÁ-CRAB  
(*Ucides cordatus*)**

*Master dissertation presented to the  
Graduate Programm in Chemistry of  
the Federal University of Sergipe to  
obtain MSc. in Chemistry.*



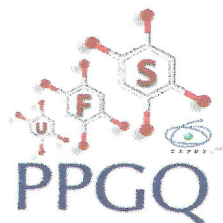
**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S192d	<p>Sampaio, Marília Fernanda Chaves</p> <p>Desenvolvimento e validação de método para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em caranguejo-uçá (<i>ucides cordatus</i>) / Marília Fernandes Chaves Sampaio ; orientador Marcelo da Rosa Alexandre. - São Cristóvão, 2016.</p> <p>99 f. : il.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Sergipe, 2016.</p> <p>1. Caranguejo. 2. Metodologia - Validação. 3. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 4. Sedimentos fluviais. I. Alexandre, Marcelo da Rosa, Orient. II. Título.</p> <p>CDU 547.6:595.384.2</p>
-------	---



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SERGIPE

Programa de Pós-graduação em  
Química - PPGQ



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação  
de Mestrado de Marília Fernanda Chaves Sampaio  
apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Química da Universidade Federal de Sergipe em  
29/07/2016.

Prof. Dr. Marcelo da Rosa Alexandre  
Departamento de Química - UFS

Prof.ª Dr.ª Luciane Pimenta Cruz Romão  
Departamento de Química- UFS

Prof. Dr. Alain Gaujac  
Instituto Federal de Sergipe- IFS

## RESUMO

O manguezal tem um papel importante para o homem desde a pré-história em razão da abundância de recursos alimentares que fornece, além de constituir um criadouro natural que serve de abrigo para diversas espécies de animais, entre eles o caranguejo-uçá, que é de grande importância para a manutenção desse ecossistema. Contudo, esse ambiente é destino final de muitos contaminantes, entre eles os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). O objetivo desse trabalho é desenvolver e validar um método, utilizando a técnica de extração por dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS), para a determinação de HPA prioritários em hepatopâncreas do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*). As melhores condições de extração foram obtidas utilizando 0,5 g do hepatopâncreas, 1,5 g de florisil como dispersante e 0,5 g de sulfato de sódio como agente secante, juntamente com 0,5 g de C<sub>18</sub> como adsorvente auxiliar e eluição com 10 mL de acetonitrila. A validação analítica foi realizada através da obtenção dos parâmetros de: seletividade; linearidade, que foi estimada a partir do coeficiente de correlação, apresentando valores maiores do que 0,990 para todos os HPA, numa faixa de concentração de 5 ng mL<sup>-1</sup> a 100 ng mL<sup>-1</sup>; limites de detecção e quantificação, nos intervalos de 0,2 a 3,0 ng g<sup>-1</sup> e 0,6 a 9,8 ng g<sup>-1</sup> respectivamente; exatidão e precisão, com valores de recuperação variando entre 60-111% e coeficientes de variação na faixa de 1-19%, para níveis de concentração 10, 25 e 50 ng mL<sup>-1</sup>; e robustez, que foi avaliada por padronização externa, mostrando-se robusto para a maioria dos HPA testados, com exceção do naftaleno. Para a aplicação do método validado foram coletados caranguejos-uçá de mangues localizados nos rios Gameleiro (P1), Vaza-Barris (P2), Poxim (P3) e Sergipe (P4). No ponto P3 foi encontrada uma concentração de 26,6 ng g<sup>-1</sup> do benzo[a]antraceno, que é considerado como “provavelmente cancerígeno” ao homem. Os sedimentos de mangue também foram coletados nos mesmos pontos e extraídos por um método já validado, no qual se baseia na extração por ultrassom, e analisados por GC/MS. Os valores

de concentração encontrados para o  $\Sigma$ HPA variaram entre 12,5 – 813,6 ng g<sup>-1</sup> de sedimento seco.

**PALAVRAS-CHAVE:** Caranguejo-uçá, Hepatopâncreas, Validação, HPA, MSPD, GC/MS, Sedimento.

## ABSTRACT

The mangrove plays an important role for the man since prehistoric times because of the abundance of food resources it provides, in addition to being a natural breeding that serves as a shelter for several species of animals, including uçá-crab, which is great importance for the maintenance of this ecosystem. However, this environment is the final destination of many pollutants, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). The aim of this work is to develop and validate a method using the extraction technique for matrix solid-phase dispersion (MSPD) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) for the determination of priority PAH in hepatopancreas of uçá-crab (*Ucides cordatus*). The best extraction conditions were obtained using 0.5 g hepatopancreas, 1.5 g florisil as a dispersant and 0.5 g sodium sulfate as the drying agent, along with 0.5 g of C<sub>18</sub> as an auxiliary adsorbent, and eluting with 10 mL of acetonitrile. The analytical validation was performed from the parameters: selectivity; linearity, which was estimated from the correlation coefficient, with values greater than 0.990 for all PAH in a concentration range of 5 ng mL<sup>-1</sup> to 100 ng mL<sup>-1</sup>; limits of detection and quantification in the intervals of 0.2 to 3.0 ng g<sup>-1</sup> and 0.6 to 9,8 ng g<sup>-1</sup> respectively; accuracy and precision, with recovery values between 60-111% and coefficients of variation in the 1-19% range for concentration levels of 10, 25 and 50 ng mL<sup>-1</sup>; and robustness, which was assessed by external standard, being robust for most of the HPA tested, with the exception of naphthalene. For the application of validated method were collected uçá-crab from mangroves located in the Gameleiro rivers (P1), Vaza-Barris (P2), Poxim (P3) and Sergipe (P4). At point P3 found a concentration of 26.6 ng g<sup>-1</sup> of benzo[a]anthracene, which is considered as "probably carcinogenic". Mangrove sediments were also collected the same points and extracted by a method already validated, which is based on ultrasound extraction, and analyzed by GC/MS. The concentration values found for ΣPAH ranged from 12.5 to 813.6 ng g<sup>-1</sup> of dry sediment.

**KEYWORDS:** Uçá-crab, Hepatopancreas, Validation, PAH, MSPD, GC/MS, Sediment.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Manguezais.....	2
1.2 Caranguejo-uçá ( <i>Ucides cordatus</i> ).....	4
1.3 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) .....	6
1.3.1 Toxicidade dos HPA .....	10
1.3.2 Formação dos HPA.....	11
1.3.3 Fontes de HPA.....	13
1.4 Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos .....	15
1.4.1 <i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i> .....	16
1.4.2 Aplicações de MSPD .....	17
1.5 Validação de método analítico .....	19
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Geral .....	21
2.2 Específicos.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
3.1 Reagentes e adsorventes .....	22
3.2 Padrões certificados.....	22
3.3 Equipamentos .....	23
3.4 Coleta e armazenamento de amostras .....	23
3.5 Procedimento de preparo de amostras por MSPD.....	24

3.6 Avaliação granulométrica do sedimento .....	25
3.7 Avaliação do teor de matéria orgânica no sedimento .....	26
3.8 Extração e <i>clean-up</i> das amostras de sedimento de mangue .....	26
3.9 Preparo das curvas analíticas .....	28
3.10 Condições cromatográficas de análise .....	29
3.11 Limpeza de materiais .....	31
3.11.1 Vidrarias comuns .....	31
3.11.2 Descontaminação dos materiais de extração .....	31
3.12 Descarte de resíduos .....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
4.1 Otimização do método cromatográfico.....	32
4.2 Desenvolvimento da metodologia de preparo da amostra por MSPD.....	32
4.2.1 Seleção do adsorvente e solvente de extração .....	33
4.3 Validação do método analítico .....	37
4.3.1 Linearidade e sensibilidade .....	37
4.3.2 Seletividade .....	39
4.3.2.1 Análise do efeito matriz .....	41
4.3.3 Exatidão e Precisão .....	43
4.3.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	46
4.2.5 Robustez.....	46
4.4 Avaliação da granulometria e do teor de matéria orgânica (MO) .....	48

4.5 Determinação quantitativa de HPA em sedimentos de mangue e caranguejo-uçá .....	50
4.5.1 Determinação quantitativa de HPA em sedimento de mangue .....	50
4.5.2 Determinação quantitativa de HPA em hepatopâncreas de caranguejo-uçá .....	53
5. CONCLUSÕES .....	56
6. REFERÊNCIAS .....	57
APÊNDICE .....	68

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, que sei que me acompanha e me protege em todos os momentos;

Ao meu orientador Marcelo da Rosa Alexandre, por me aceitar de portas abertas e por todos os ensinamentos passados;

Aos meus amigos Michel, Antônio e Ewerton, que me auxiliaram em todos os momentos que precisei;

Agradeço à minha família, especialmente a minha mãe, a quem devo tudo o que sou e conquistei até hoje;

Ao meu melhor amigo e namorado Edson, que está sempre ao meu lado nos bons e maus momentos. Agradeço também a sua família, por me fazerem sentir tão amada.

Aos meus amigos da UFS, passando pelos da graduação, dos laboratórios METABIO, LCP e LEMON, por todos os momentos de felicidade que me proporcionaram;

Aos professores do Departamento de Química da UFS, por todos os ensinamentos e puxões de orelha que serviram para a minha formação acadêmica;

À Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Química e Programa de Pós-Graduação em Química, por proporcionarem a estrutura necessária para a realização deste trabalho;

À CAPES, pelo auxílio financeiro;

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DAD - Detector de Arranjo de Diodos

GC- Cromatografia Gasosa (do inglês *Gas Chromatography*)

HPA - Hidrocarboneto Policíclico Aromático

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

IARC - Agência Internacional de Pesquisa de Câncer (do inglês *International Agency for Research on Cancer*)

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

Kow - Coeficiente de partição octanol/água

LD - Limite de Detecção

LQ - Limite de Quantificação

MM - Massa Molar

MO - Matéria Orgânica

MS - Espectrometria de Massas (do inglês *Mass Spectrometry*)

MSPD - Dispersão da Matriz em Fase Sólida (do inglês *Matrix Solid-Phase Dispersion*)

NIOSH - Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional (do inglês *National Institute for Occupational Safety and Health*)

NOAA - Administração Nacional Oceânica e Atmosférica (do inglês *National Oceanic Atmospheric Administration*)

PTV - Temperatura Programada de Vaporização (do inglês *Programmed Temperature Vaporizing*)

SPE - Extração em Fase Sólida (do inglês *Solid Phase Extraction*)

USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês *United States Environmental Protection Agency*)

UV-Vis- Ultravioleta Visível

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de uma região estuarina.. .....	3
Figura 2 - A) caranguejo-uçá; B) parte interna da carapaça, H : hepatopâncreas.....	6
Figura 3 - Estrutura molecular dos dezesseis HPA prioritários monitorados pela USEPA. ....	10
Figura 4 - Esquema para a formação de HPA por meio de pirólise.. .....	12
Figura 5 - Esquema das etapas de extração por MSPD .....	16
Figura 6 - Cromatograma de íons total obtido por CG/MS (modo SIM) da solução conjunta de HPA 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	32
Figura 7 - Esquema da montagem da coluna de extração por MSPD .....	34
Figura 8 - Extrato final utilizando como solvente de extração A) acetonitrila, B) hexano e C) diclorometano. ....	35
Figura 9 - Gráfico das recuperações médias (n=3) dos HPA, do padrão sub- rogado p-terfenil-D14 e seus respectivos coeficientes de variação, com nível de fortificação 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ .....	36
Figura 10 - Aspecto do material homogeneizado.....	36

Figura 11 - Cromatogramas obtidos por GC/MS no método SIM: (ROSA) extrato controle da amostra (branco); (PRETO) extrato da matriz fortificado com a solução conjunta de HPA na concentração de  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  ..... 39



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas dos HPA prioritários. ....	8
Tabela 2 - Níveis de concentração de HPA encontrados em diversas matrizes.. .....	9
Tabela 3 - Classificação dos HPA de acordo com seu potencial carcinogênico.. .....	11
Tabela 4 - Níveis de HPA totais em sedimentos encontrados em diferentes locais.. ....	13
Tabela 5 - Trabalhos utilizando MSPD em diversas matrizes .....	17
Tabela 6 - Pontos de amostragem e suas coordenadas .....	24
Tabela 7 - Concentrações e volume das soluções utilizadas para o preparo das curvas analíticas.....	28
Tabela 8 - Condições cromatográficas utilizadas nas análises .....	29
Tabela 9 - Tempo de retenção, íons para identificação e quantificação dos HPA, padrões internos e padrão sub-rogado p-terfenil-D <sub>14</sub> .....	30
Tabela 10 - Equações da reta das curvas analíticas dos 16 HPA no solvente e no extrato da matriz e seus coeficientes de correlação (r) .....	38
Tabela 11 - Razão dos coeficientes angulares (extrato/solvente) .....	42

Tabela 12 - Resultados de recuperação e coeficientes de variação para os três níveis de fortificação testados .....	45
Tabela 13 - Limite de detecção e quantificação dos HPA estudados.....	46
Tabela 14 - Recuperações médias (n=3) e coeficientes de variação obtidos no teste de robustez .....	48
Tabela 15 - Escala granulométrica de Wentworth.....	49
Tabela 16 - Teor de lama e matéria orgânica encontrada nos sedimentos de mangue coletados .....	50
Tabela 17 - Concentração média (n=2) em $\text{ng g}^{-1}$ encontrada dos HPA nas amostras de sedimento de mangue .....	51
Tabela 18 - Concentração média ( $\text{ng g}^{-1}$ ) encontrada dos HPA nas amostras de sedimento de mangue em comparação com os valores estabelecidos pela NOAA. ....	52
Tabela 19 - Concentração total de HPA ( $\Sigma\text{HPA}$ ) encontrada em sedimentos de mangue de diferentes locais.....	53
Tabela 20 - Concentração média (n=2) em $\text{ng g}^{-1}$ encontrada dos HPA nas amostras de hepatopâncreas de caranguejo-uçá .....	54
Tabela 21 - Concentração total de HPA ( $\Sigma\text{HPA}$ ) encontrada em hepatopâncreas de crustáceos .....	55

## 1. INTRODUÇÃO

O manguezal é um ecossistema costeiro de transição entre os ambientes terrestre e marinho característico de regiões tropicais e subtropicais e sujeito ao regime das marés. Ocorre em regiões costeiras abrigadas como estuários, baías e lagunas, apresentando condições propícias para alimentação, proteção e reprodução de muitas espécies animais [1]. Contudo, os diversos usos da zona costeira como pesca, aquicultura, agricultura, assentamentos humanos, portos, recreação, turismo, mineração e indústrias fazem com que esse ecossistema seja exposto à intensa degradação por atividades antrópicas, as quais têm provocado danos irreparáveis ao ambiente e a sua biota [2].

Quando poluentes orgânicos alcançam sistemas aquáticos eles são adsorvidos ao material particulado em suspensão, acumulando-se no compartimento sedimentar [3]. O sedimento de mangue por ser rico em carbono orgânico torna-se um local preferencial para captação e acumulação desses poluentes. Quando incorporados no sedimento, estes contaminantes podem sofrer modificações químicas e biológicas que os disponibilizam à biota, aumentando seus efeitos nocivos [3, 4].

Dentre as espécies endêmicas de zonas de mangue, o *Ucides cordatus*, popularmente conhecido como caranguejo-uçá, é um macrocrustáceo bentônico de grande importância para o ecossistema, pois desempenha papel essencial na dinâmica deste ambiente. O ato da procura de alimento, a escavação das tocas e a movimentação destes animais revirando o sedimento permitem uma maior oxigenação do substrato e liberação de nutrientes que enriquece a massa d'água [5]. Por esta razão, o caranguejo, juntamente com o sedimento, são potenciais acumuladores de poluentes orgânicos, entre eles os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) [6, 7].

HPA são definidos como compostos orgânicos que possuem dois ou mais anéis aromáticos de carbono e hidrogênio fundidos [8]. Eles são

poluentes orgânicos de importância ambiental e de interesse toxicológico, pois muitos apresentam propriedades pré-carcinogênicas e/ou mutagênicas para homens e animais [9]. Para a determinação desses poluentes orgânicos, algumas metodologias de extração são utilizadas, dentre elas encontra-se o método de Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD).

A MSPD pode ser considerada como uma técnica alternativa aos métodos clássicos, especialmente para amostras sólidas e semissólidas. É simples, requer uma pequena quantidade de amostra, usa menos solvente do que as técnicas convencionais, não requer preparação e manutenção de equipamentos e oferece a possibilidade de realizar simultaneamente extração e limpeza da amostra [10].

Diante do exposto, o monitoramento e determinação de HPA em amostras ambientais torna-se necessário para avaliação das condições do meio ambiente de uma dada região. Neste contexto, o objetivo desse trabalho é desenvolver um método analítico para determinação de HPA em hepatopâncreas de caranguejo-uçá baseado na MSPD e GC/MS, bem como determinar suas concentrações em amostras coletadas em manguezais da costa sergipana, além da sua correlação com as quantidades encontradas nos sedimentos destes mangues.

## 1.1 Manguezais

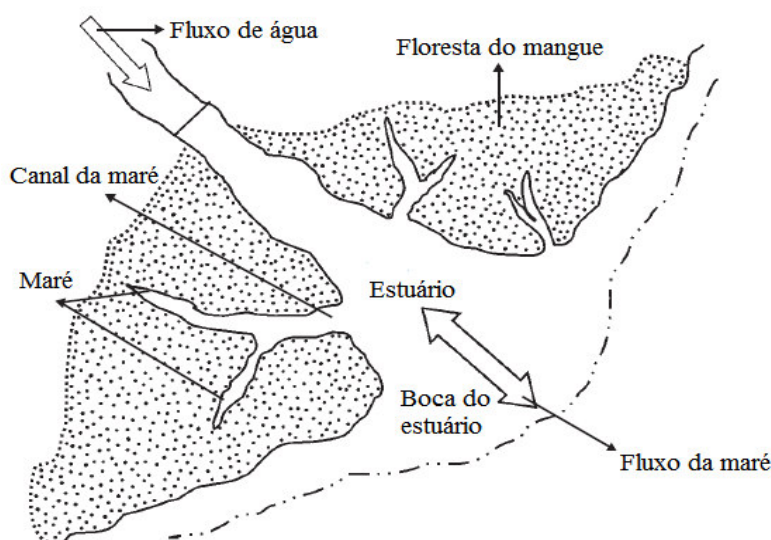
Os manguezais são conhecidos e estudados desde os tempos antigos. Descrições por Nearco (325 aC) e Teofrasto (305 aC) de árvores de *Rhizophora* no Mar Vermelho e no Golfo Pérsico são os primeiros registros conhecidos. Plutarco (70 dC) e Abou'l Abass (1230) escreveram sobre *Rhizophora* e suas mudas [11]. Kathiresan *et al.*, 2001 [11] relataram que há apenas 14 referências antes de 1600, 25 referências a partir do século XVII, 48 referências no século XVIII e 427 no século XIX. Em contraste, entre os anos de 1900 e 1975 houve 4500 referências e cerca de 3000 entre 1978 e 1997, ilustrando o aumento no interesse em estudar áreas de manguezais.

Ecologicamente, os manguezais são definidos como conjunto de árvores e arbustos que crescem na região entre marés de costas tropicais e

subtropicais, nas áreas onde a água do rio se mistura com água do mar [12] (Figura 1). A grande importância do manguezal está em se constituir como um criadouro natural, além de servir de abrigo para diversas espécies de peixes, camarões, caranguejos, entre outros. No ano de 2000, a área total de mangues no mundo foi estimada em 137,76 mil km<sup>2</sup> em 118 países [13]. No Brasil, com uma zona costeira de cerca de 8.500 km de extensão, os manguezais existem desde a foz do rio Oiapoque, no estado do Amapá (4° 30' latitude Norte), até o estado de Santa Catarina, tendo como limite sul o município de Laguna (28° 30' latitude Sul) [5], constituindo a terceira maior área de mangue no mundo, respondendo por 7% do total e 50% da América do Sul [2].

Sergipe possui hoje 25.626,24 ha de área total de manguezal, correspondendo a 1,7% do território, os quais estão distribuídos em quatro regiões, onde 2.911,07 ha estão situados na região do Baixo São Francisco; 291,31 ha no Leste Sergipano, 13.325,46 na Grande Aracaju e 8.343,23 ha na região Sul Sergipano [14].

**Figura 1** - Esquema de uma região estuarina. **Fonte:** adaptada de SELVAM, 2004 [12].



No ecossistema de manguezal a força das marés é branda e a velocidade das correntes é baixa, o que favorece a intensa deposição de

sedimentos finos e de matéria orgânica. Devido a isso, os contaminantes presentes na água, tais como os metais, hidrocarbonetos saturados e HPA, se agregam as partículas sólidas, tendo como o destino final a deposição sedimentar [15].

Uma vez introduzidos no ecossistema de manguezal, os compostos orgânicos derivados de hidrocarbonetos sofrerão uma série de processos físico-químicos. Os principais processos envolvidos são a transferência para o sedimento, a incorporação à biota, a degradação biológica e química, a solubilização, a dispersão física, a evaporação dos compostos e a adsorção [16]. Estudos vêm reportando que a concentração de HPA total em mangues presentes em áreas urbanas está crescendo. No entanto, ainda são insipientes os estudos realizados para avaliar a distribuição e acumulação de HPA nesse ecossistema, fazendo com que seja necessário cada vez mais o monitoramento e caracterização química desses ambientes [4, 17].

## **1.2 Caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*)**

A contaminação do ambiente marinho tem sido uma preocupação crescente, motivada pelas constantes ocorrências e efeitos tóxicos de compostos orgânicos neste ecossistema. A biota e o sedimento são mais frequentemente utilizados para monitoramento ambiental, assumindo-se que as concentrações de poluentes encontrados nesses compartimentos refletem os níveis presentes no ambiente [18].

Os organismos que acumulam contaminantes, mas que são resistentes a sua toxicidade, podem ser usados para acompanhar a contaminação no ambiente marinho [19]. Entre os vários organismos aquáticos, os invertebrados têm sido preferidos para avaliação ambiental. Eles são os componentes principais em todos os ecossistemas e, por causa da população geralmente numerosa, podem ser usados para análise com poucos danos para a dinâmica populacional [6].

Os caranguejos são membros característicos da fauna de invertebrados de mangue e são morfológica e fisiologicamente bem adaptados ao seu ambiente. Entre as espécies de caranguejo existentes, encontra-se o *Ucides cordatus* que é muito explorado ao longo de todo o litoral brasileiro. Destacam-se na produção os estados do nordeste, principalmente o Maranhão, Piauí, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Sergipe. Destes, o Piauí é atualmente o maior produtor, seguido de Sergipe [20].

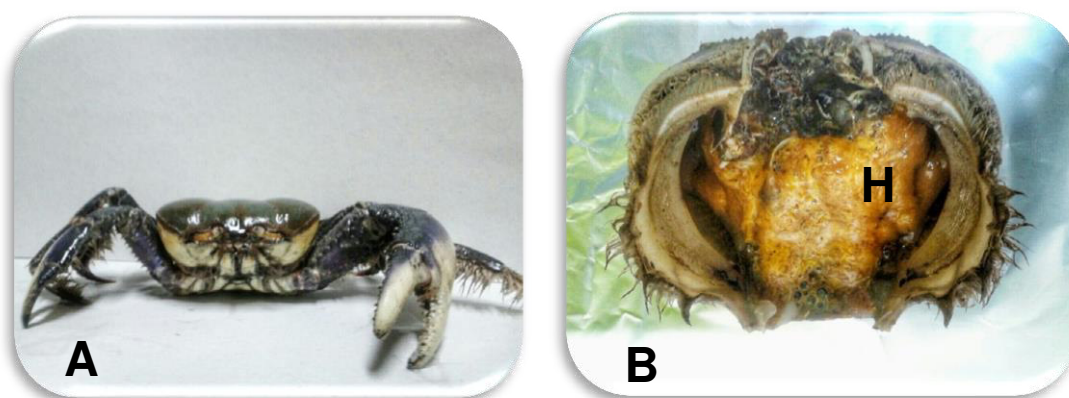
Esta espécie de crustáceo é popularmente conhecida como caranguejo-uçá (Figura 2A) e possui grande importância ecológica e econômica, sendo comumente encontrada ao longo da costa atlântica das Américas tropicais e subtropicais [5]. O caranguejo-uçá alcança altos valores de comercialização nas grandes cidades, em função da sua elevada procura pelos turistas. No Brasil, segundo o Boletim de Pesca e Agricultura, foram produzidas 8.607,5 t de caranguejo-uçá em 2011 [21]. Em Sergipe, as principais localidades de captura são os estuário do São Francisco, rio Japaratuba, rio Sergipe, rio Piauí e Vaza-Barris [22].

O caranguejo-uçá possui características importantes que viabilizam o seu uso para o estudo de bioacumulação, uma vez que se alimentam principalmente em regiões próximas ao mangue, interagem com o sedimento durante a saída e entrada da toca, têm uma taxa de crescimento pequena e um ciclo de vida longo e são abundantes e fáceis de capturar no campo [23].

Dentre os contaminantes estudados em caranguejos, como metais e agrotóxicos [23, 24], encontram-se também a classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Estes compostos são facilmente absorvidos por seres vivos devido a sua alta lipofilicidade, expressa por meio do coeficiente de partição octanol/água ( $K_{ow}$ ), que favorece a rápida transferência da fase aquosa para compartimentos lipofílicos [25]. Nudi *et al.*, 2010 [26] demonstraram a habilidade de *Ucides cordatus* metabolizar o pireno (HPA), biotransformando-o em compostos mais polares e os excretando através do sistema urinário. Essa biotransformação ocorre no hepatopâncreas (Figura 2B), ou glândula digestiva do intestino médio, que é um órgão que exerce importante papel no metabolismo dos crustáceos, semelhante ao fígado em vertebrados, desempenhando além da digestão outras funções, tais como a absorção e

estoque de lipídios, glicogênio e minerais, relacionados com processos metabólicos cíclicos a exemplo da muda e reprodução [27]. Sendo assim, a determinação de contaminantes em hepatopâncreas de caranguejos deve refletir os níveis reais no ambiente [6,23].

**Figura 2** - A) caranguejo-uçá; B) parte interna da carapaça, H: hepatopâncreas. **Fonte:** Marília Fernanda Chaves Sampaio.



### 1.3 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA)

O início do estudo dos HPA ocorreu com o isolamento do benzo[a]pireno (BaP) do carvão, em 1931. A sua identificação como uma nova substância química em 1933 permitiu demonstrar que o BaP é um forte agente cancerígeno em animais. Em 1970, o BaP (e outros HPA) foi caracterizado como agente cancerígeno de distribuição mundial, em ambientes respiráveis, como constituinte de aerossóis urbanos [28].

Os HPA são compostos orgânicos amplamente distribuídos no ambiente, formados pela combustão incompleta de materiais orgânicos naturais ou durante processos antropogênicos [29]. Eles contêm dois ou mais anéis aromáticos fundidos, e de acordo com o número de anéis eles podem ser classificados como leves (2-3 anéis) ou pesados (4-6 anéis), sendo estes últimos mais estáveis e tóxicos dos que os primeiros.



As propriedades físico-químicas dos HPA são importantes uma vez que vão determinar a sua distribuição e comportamento dentro dos diferentes compartimentos ambientais existentes. Com exceção do naftaleno, que é relativamente solúvel, os HPA têm baixa solubilidade em água. Eles são altamente lipofílicos e suas afinidades por fases orgânicas, expressas por meio do coeficiente de partição octanol/água ( $K_{ow}$ ), são elevadas e aumentam com suas massas molares [30] (Tabela 1). Devido a estas características, os HPA tendem a concentrar-se em sedimentos ou a permanecerem associados à matéria orgânica em suspensão quando em meio aquático.

Por outro lado, a volatilidade destes compostos diminui com o aumento da massa molar e, conseqüentemente, HPA de menores massas são mais voláteis e apresentam maiores pressões de vapor do que os de maior massa (Tabela 1).

**Tabela 1** - Propriedades físico-químicas dos HPA prioritários. **Fonte:** adaptada de MENICONI, 2007 [32].

HPA	MM (g mol <sup>-1</sup> )	Solubilidade em água (mg L <sup>-1</sup> ) a 25 °C	Log K <sub>ow</sub>	Pressão de vapor (Pa a 25 °C)	Ponto de Ebulição (°C)
Naftaleno	128	31,8	3,4	10,5	218
Acenaftileno	152	16,1	4,1	-	265
Acenafteno	154	3,7	3,9	0,36	279
Fluoreno	166	1,98	4,2	9x10 <sup>-2</sup>	293
Fenantreno	178	1,2	4,6	1,8x10 <sup>-2</sup>	340
Antraceno	178	1,29	4,5	7,5x10 <sup>-4</sup>	340
Fluoranteno	202	0,26	5,2	1,2x10 <sup>-3</sup>	-
Pireno	202	0,15	5,2	8,86x10 <sup>-4</sup>	360
Benzo[a]antraceno	228	1,1x10 <sup>-2</sup>	5,8	7,3x10 <sup>-6</sup>	400
Criseno	228	3x10 <sup>-3</sup>	5,8	5,7x10 <sup>-7</sup>	-
Benzo[b]fluoranteno	252	7,6x10 <sup>-4</sup>	6,8	-	-
Benzo[k]fluoranteno	252	1,5x10 <sup>-3</sup>	6,6	6,0x10 <sup>-7</sup>	480
Benzo[a]pireno	252	3,8x10 <sup>-3</sup>	6,4	7,3x10 <sup>-7</sup>	496
Indeno[1,2,3-cd]pireno	276	1,9x10 <sup>-4</sup>	6,6	-	-
Dibenzo[a,h]antraceno	278	5,1x10 <sup>-4</sup>	6,7	3,7x10 <sup>-10</sup>	-
Benzo[g,h,i]perileno	276	5,5x10 <sup>-3</sup>	7,0	6,0x10 <sup>-8</sup>	-

Como reflexo desses fatores, os HPA com dois ou três anéis tendem a concentrar-se na fase gasosa, enquanto os formados por quatro, cinco ou seis anéis concentram-se principalmente no material particulado atmosférico [30], portanto, tendem a se depositar junto destes no meio. Alguns níveis de concentração de HPA encontrados em algumas matrizes são mostrados da Tabela 2.

**Tabela 2** - Níveis de concentração de HPA encontrados em diversas matrizes.

**Fonte:** NETTO *et al.*, 2000 [31].

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Concentração</b>
Ar	1,3 a 500 ng/m <sup>3</sup>
Solo	0,8 ng/kg a 100 mg/kg
Água	2,5 a 500 ng/L
Plantas	< 150 µg/kg
Alimentos	0,1 a 20 µg/kg

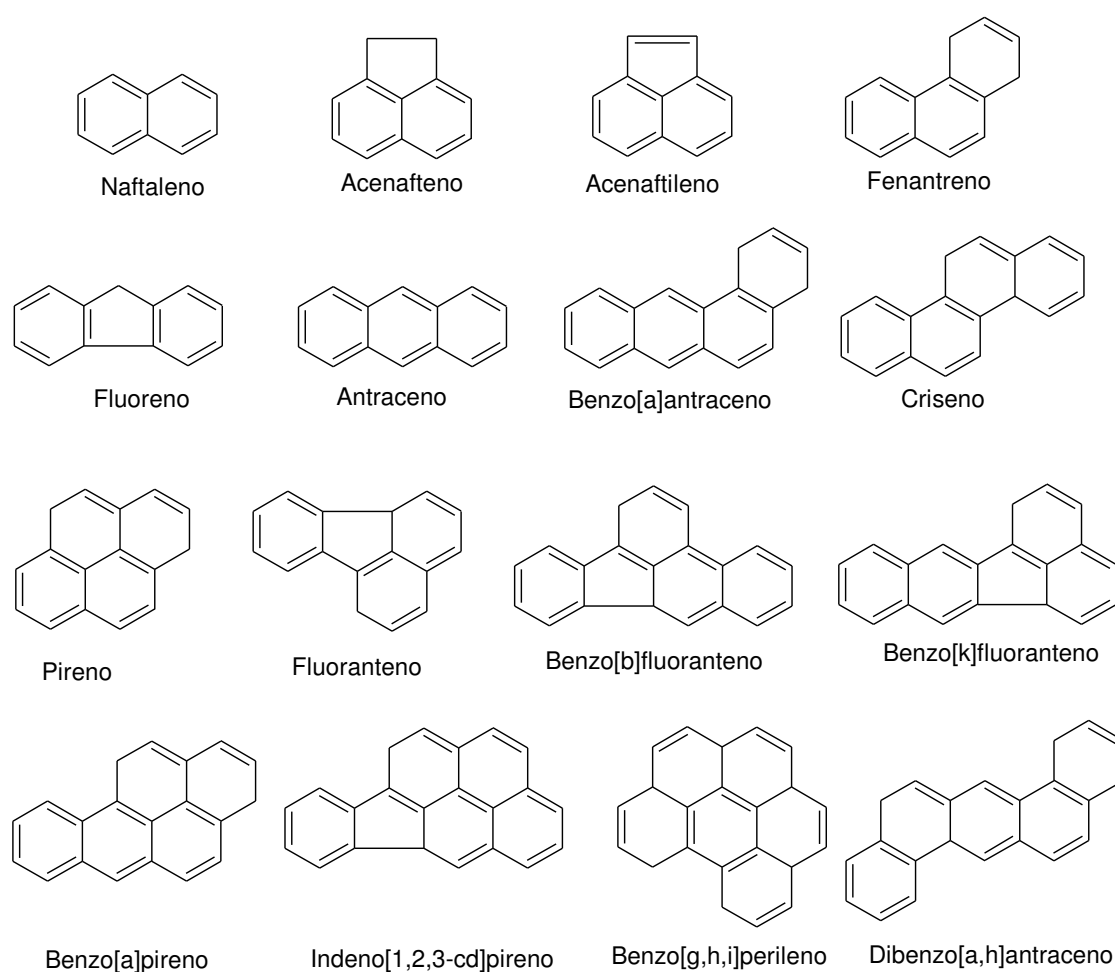
Embora existam centenas de HPA no ambiente, somente dezesseis têm sido selecionados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) e dezessete pelo Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional (NIOSH) para serem monitorados para fins reguladores. São eles: naftaleno, acenafteno, acenaftileno, fenantreno, fluoreno, antraceno, benzo[a]antraceno, criseno, pireno, fluoranteno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno, benzo[g,h,i]perileno e dibenzo[a,h]antraceno [32] (Figura 3).

Os HPA acima citados foram escolhidos para serem incluídos na lista de prioritários porque (1) há mais informações disponíveis sobre eles que dos demais; (2) eles são suspeitos de serem mais nocivos que os outros e exibirem efeitos prejudiciais que são representativos de HPA em geral; (3) há uma maior possibilidade de exposição a estes HPA que aos outros; e (4) de todos os HPA analisados, estes exibiram as maiores concentrações [34].

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente através da Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005 [35], define as concentrações

máximas dos HPA de maior massa molecular, em água doce ( $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ ), salinas e salobras ( $0,018 \mu\text{g L}^{-1}$ ). O monitoramento desses compostos se dá por sua maior toxicidade e por serem considerados mais carcinogênicos [29]. Devido também à sua atividade carcinogênica comprovada, eles têm sido largamente investigados, tanto para compreender plenamente o mecanismo de toxicidade, como para elucidar as principais fontes [35].

**Figura 3** - Estrutura molecular dos dezesseis HPA prioritários monitorados pela USEPA.



### 1.3.1 Toxicidade dos HPA

Do ponto de vista toxicológico, a principal importância dos HPA são as evidências de sua associação a vários tipos de câncer em seres humanos, como de pulmão, bexiga, colo, reto, esôfago, entre outros. Contudo, eles não

são diretamente carcinogênicos, e necessitam sofrer ativação metabólica preliminar para se tornarem capazes de reagir com o DNA [31]. As propriedades carcinogênicas e mutagênicas de alguns HPA conferem a esses contaminantes a razão para a sua inclusão na maioria dos programas de monitoramento ambiental e saúde humana em diferentes países do mundo.

Dentre os HPA, o benzo[a]antraceno, o benzo[a]pireno e o benzo[g,h,i]perileno são considerados os mais tóxicos, classificados como “provavelmente cancerígenos” ao homem pela organização internacional IARC (*International Agency for Research on Cancer*) e pela USEPA, seguidos pelo benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno e indeno[1,2,3-cd]pireno, classificados como “possivelmente carcinogênico” ao homem (Tabela 3).

**Tabela 3** - Classificação dos HPA de acordo com seu potencial carcinogênico.

**Fonte:** Adaptada de Meniconi, 2007 [32].

HPA	Carcinogenicidade	
	IARC <sup>a</sup>	USEPA <sup>b</sup>
Naftaleno	2B	C
Acenaftileno	-	D
Fenantreno	3	D
Antraceno	3	D
Fluoranteno	3	D
Pireno	3	D
Benzo[a]antraceno	2A	B2
Criseno	3	B2
Benzo[b]fluoranteno	2B	B2
Benzo[k]fluoranteno	2B	B2
Benzo[a]pireno	2A	B2
Indeno[1,2,3-cd]pireno	2B	B2
Benzo[g,h,i]perileno	2A	B2
Dibenzo[a]antraceno	3	D

<sup>a</sup> IARC:

1: carcinogênico ao homem  
 2A: provavelmente carcinogênico ao homem  
 2B: possivelmente carcinogênico ao homem  
 3: não classificado

<sup>b</sup>USEPA:

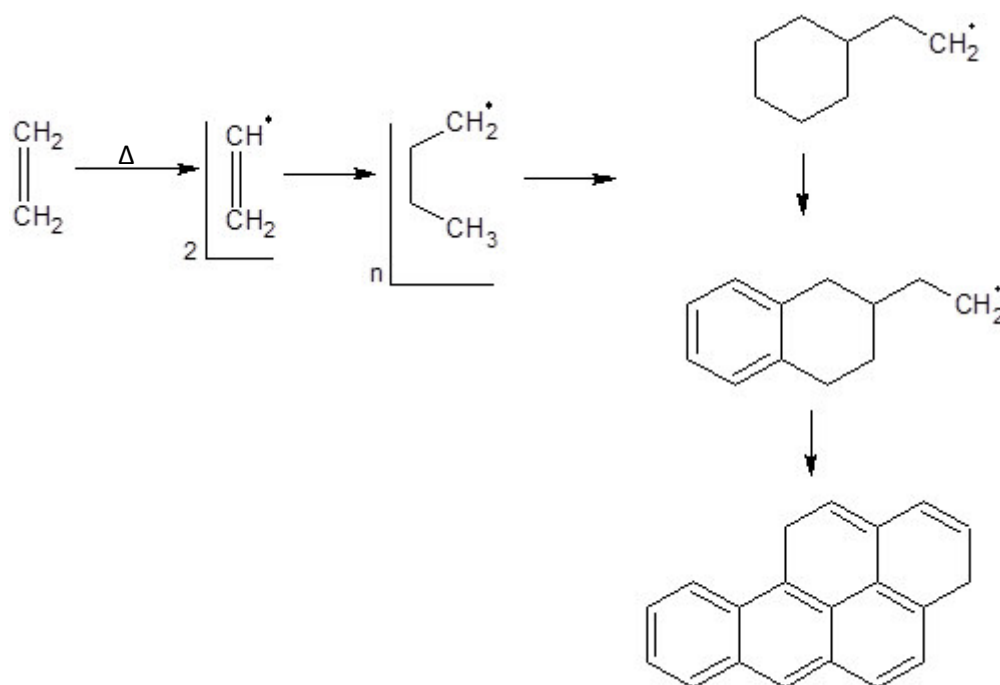
A: carcinogênico ao homem  
 B1 e B2: provavelmente carcinogênico ao homem  
 C: possivelmente carcinogênico ao homem  
 D: não classificado  
 E: provavelmente não carcinogênico

### 1.3.2 Formação dos HPA

Processos pirolíticos ou de combustão incompleta formam HPA quando a matéria orgânica é aquecida [30]. A formação pirolítica de HPA é bastante complexa e variável, dependendo de fatores como pressão e temperatura. O esquema do mecanismo aceito para esta reação envolve a polimerização via

radicais livres, em várias etapas, até a formação de núcleos aromáticos condensados [28] (Figura 4). Embora a pirólise de moléculas pequenas, como o metano e o acetileno, possam levar à formação de HPA, certas moléculas aromáticas maiores também podem servir de ponto de partida para HPA mais complexos.

**Figura 4** - Esquema para a formação de HPA por meio de pirólise. **Fonte:** LOPES *et al.*, 1996 [28].



Como mencionado, as características dos HPA formados dependem das temperaturas envolvidas, do tempo de reação e da matéria orgânica original [30]. Todos os compostos contendo carbono e hidrogênio podem atuar como precursores de HPA a elevada temperatura (500-700°C). Contudo, em altas temperaturas as possíveis cadeias alifáticas ligadas aos anéis se tornam pouco estáveis, havendo a diminuição de seus comprimentos, privilegiando grupamentos pequenos como grupo metila e HPA não alquilados. Os HPA também podem ser formados em temperaturas mais baixas (100-150°C), mas é necessário um prazo maior em escala de tempo geológica. Processos lentos

e a baixas temperaturas, como a formação do petróleo, favorecem a produção de alquil-derivados de HPA [30, 36].

### 1.3.3 Fontes de HPA

Os HPA são emitidos por fontes naturais e antropogênicas. As principais fontes antropogênicas são de origem pirolítica e petrogênica. A emissão por fontes antropogênicas tende a ser maior que por fontes naturais, onde a combustão incompleta por fontes estacionárias e móveis é, provavelmente, a mais importante delas, por sua ampla distribuição e pelas quantidades emitidas [30]. Estudos vêm demonstrando uma relação direta entre os níveis de HPA no ambiente com a presença humana. Áreas consideradas urbanas e/ou industriais apresentam em sedimento níveis de HPA superiores em até duas ordens de grandeza, quando comparadas com regiões remotas do globo, ou consideradas distantes de possíveis fontes pontuais de contaminação [37] (Tabela 4).

**Tabela 4** - Níveis de HPA totais em sedimento encontrados em diferentes locais. **Fonte:** adaptada de MEIRE *et al.*, 2007 [37].

Áreas remotas	
Localização	HPA total (ng g <sup>-1</sup> )
Flórida, NE (EUA)	1.800
Lago Iarto, LA (EUA)	100
Arresjoen (Ártico)	260
Europa Central	1.100
Lago Laja (Chile)	359
Parna, Serra da Bocaina, RJ (Brasil)	115
Áreas urbanas e industriais	
Lago Michigan (EUA)	3.500
Lago Zurich (CH)	15.000
Washington (EUA)	7.000
Priest pot (RU)	16.000

Rio Paraíba do Sul, RJ (Brasil)	40.000
Baía de Guanabara, RJ (Brasil)	8.035
Baía de Todos os Santos, BA (Brasil)	4.163
Lagoa dos Patos, RS (Brasil)	11.780
Estuário de Santos, SP (Brasil)	68.130

Sabe-se da existência de diversas fontes de HPA, onde é possível citar algumas delas com sendo [30]:

- Pirólise ou queima de matéria orgânica recente (lenha, vegetação) ou fóssil (petróleo e derivados, carvão), por causas naturais (incêndios naturais de florestas) ou antropogênicas (uso de carvão ou lenha pra cozinhar, uso de combustíveis, queimadas).
- Derramamento de petróleo durante sua extração, transporte ou processamento.
- Industrial, no coqueamento de carvão e na aplicação e/ou síntese de HPA.
- Na disposição de resíduos domésticos ou industriais.
- Vulcões e áreas de alta atividade (hidro)geotérmica.
- Produção de alumínio, ferro e aço e outras fundições.
- Queima de resíduos sólidos.
- Fumaça de cigarro.

Alguns processos de preparo de alimentos tais como defumação e fritura com óleo de cozinha e queima de incensos também contribuem como fonte pirolítica de HPA [32].

Os HPA são oriundos também de fontes móveis ou estacionárias. O motor de combustão interna, uma fonte móvel de HPA, é o principal emissor para o ambiente, estando presente em diversos tipos de transportes [28]. Segundo Lopes *et al.*, 1996 [28], estudos realizados nos Estados Unidos, nos anos de 1990 e 1991, identificaram que as fontes veiculares contribuíam com 35% do total de HPA emitidos. As fontes estacionárias são subdivididas entre as utilizadas na geração de energia elétrica e calor, e aquelas ligadas à atividade industrial e de incineração.



A contribuição de fontes naturais de HPA é muito limitada, restringindo-se praticamente à queima espontânea de florestas e emissões vulcânicas. Meniconi, 2007 [32] cita ainda a exsudação de petróleo através de fendas nas rochas sedimentares, as transformações diagenéticas de produtos naturais (tais como os terpenóides, esteróides, pigmentos e quinonas), a erosão de sedimentos continentais e os processos de biossíntese por organismos tais como bactérias, algas e fungos, como fontes naturais de HPA.

#### **1.4 Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos**

A determinação dos HPA inclui basicamente três etapas, que são o preparo da amostra, a extração dos analitos e a determinação dos mesmos por alguma técnica analítica.

O preparo da amostra é um passo crucial em todo o processo analítico, uma vez que afeta de forma significativa o tempo total necessário para completar a análise, a qualidade dos resultados e o seu custo. Na maioria dos casos, os procedimentos de preparação da amostra envolvem um grande número de etapas e manipulações antes da análise [38]. Já a etapa de extração da amostra tem como objetivo principal isolar componentes de interesse de outros compostos presentes na matriz, os quais podem interferir na determinação instrumental [39]. Quando se trata de matrizes complexas, como amostras ambientais, fluidos biológicos e alimentos, a etapa de limpeza da amostra (*clean-up*) é desejável, uma vez que nessa etapa o objetivo é a eliminação de um maior número possível de interferentes proporcionando melhor seletividade durante a análise [40].

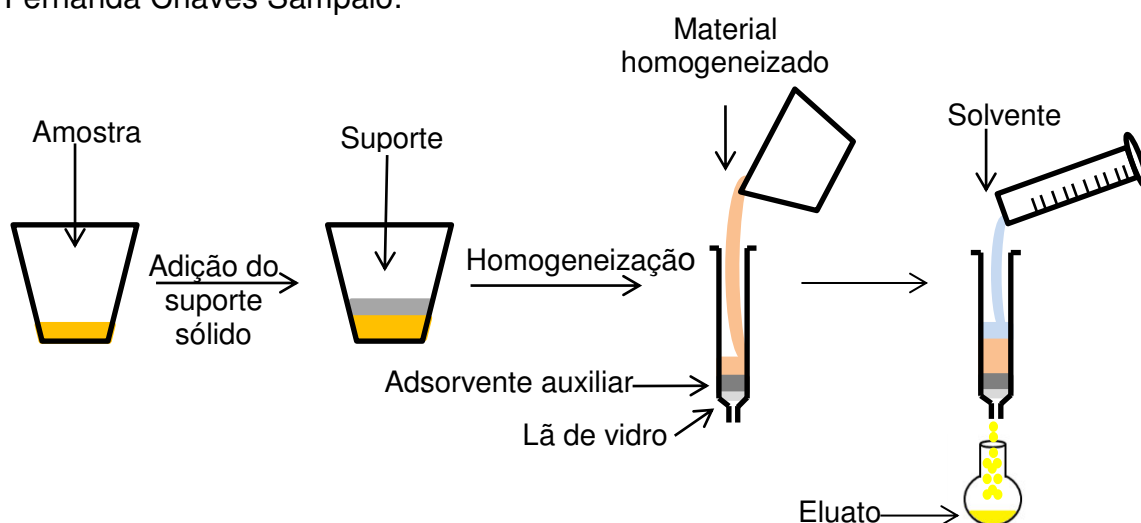
Para a extração de poluentes em amostras sólidas, semissólidas e viscosas, consideradas complexas ou não, existe uma variedade de técnicas, entre elas, pode-se destacar a *Matrix Solid-Phase Dispersion* (MSPD), que tem a vantagem de realizar em uma única etapa a extração e a limpeza da amostra.

#### 1.4.1 Matrix Solid-Phase Dispersion

A técnica de MSPD foi introduzida por Barker em 1989 para a extração de resíduos de drogas de tecido animal. O princípio básico da técnica está na pesagem da amostra, seguido da sua maceração com um adsorvente (suporte sólido), que atua como um abrasivo para produzir uma ruptura na arquitetura da amostra, facilitando o processo de extração [39, 40]. As forças intermoleculares fracas, tipo van der Waals ou interação dipolo-dipolo, atuam na etapa de homogeneização, fazendo com que o analito interaja com o adsorvente através do processo de sorção [41]. O material homogeneizado é então transferido e empacotado em uma coluna adequada para a realização de uma posterior eluição com solventes (Figura 5).

Uma outra fase sólida ou suporte pode também ser incorporados na coluna para ajudar no isolamento do analito ou com a finalidade de limpeza [42]. Materiais clássicos de fase reversa como  $C_{18}$  e  $C_8$ , assim como os de fase normal como alumina, florisil e sílica encontram-se entre os suportes sólidos mais empregados na técnica de MSPD. Além desses suportes sólidos comumente usados, materiais alternativos como polímeros, nanotubos de carbono, terra diatomácea e areia também têm sido empregados [40].

**Figura 5** - Esquema das etapas de extração por MSPD. **Fonte:** Marília Fernanda Chaves Sampaio.



Como toda técnica de extração, alguns parâmetros precisam ser definidos para se obter a melhor eficiência na extração do analito contido na amostra sem perder as outras vantagens que a técnica oferece. Entre estes parâmetros, podem ser citados a escolha do suporte sólido dispersante, bem como a sua quantidade, tempo de homogeneização da amostra com o suporte sólido, uso ou não de um adsorvente como auxiliar e a massa necessária deste, solvente e volume de eluição [41].

A técnica de extração por MSPD tem demonstrado ser uma alternativa para amostras sólidas, semissólidas, líquidas de alta viscosidade, além de ser mais rápida, possuir poucas etapas no processo, realizar a extração e o *clean-up* em uma única etapa, versátil e com melhor relação custo-benefício [41].

#### 1.4.2 Aplicações da MSPD

Diversas matrizes e analitos foram estudados fazendo uso dessa técnica, principalmente para o isolamento de medicamentos em matrizes biológicas e alimentos, bem como de pesticidas (agrotóxicos) e outros poluentes em frutas, vegetais, alimentos processados e amostras ambientais (Tabela 5).

**Tabela 5** - Trabalhos utilizando MSPD em diversas matrizes

<b>Matriz</b>	<b>Analito</b>	<b>Referência</b>
Manga e Papaia	Pesticida (agrotóxico)	Navickiene <i>et al.</i> , 2010 [43]
Banana	Pesticida (agrotóxico)	Aquino <i>et al.</i> , 2009 [44]
Ovo de galinha	Pesticida (agrotóxico)	Souza <i>et al.</i> , 2013 [45]
Chá Verde	Cafeína	Dawidowic <i>et al.</i> , 2005 [46]
Batata frita	Acrilamida	Fernandes <i>et al.</i> , 2007 [47]
Molusco	Poluentes Orgânicos	Ziarrusta <i>et al.</i> , 2015 [48]
Leite de vaca	Inseticida (agrotóxico)	Sassine <i>et al.</i> , 2004 [49]
Mel	HPA	Albero <i>et al.</i> , 2003 [50]

A determinação de contaminantes em caranguejos é reportada por vários autores, mas de uma forma geral os procedimentos de extração envolvem muitas etapas, demandam muito tempo e usam quantidades relativamente grandes de reagentes [6, 51-54]. Contudo, não foram encontrados trabalhos na literatura utilizando MSPD para extração de HPA de hepatopâncreas da espécie *Ucides cordatus*. Pode-se, no entanto, citar alguns estudos que fizeram uso das técnicas selecionadas (MSPD e cromatografia gasosa) para a determinação de HPA em outras matrizes.

Pena *et al.*, 2007 [55], utilizaram a técnica de MSPD para extração de HPA em amostras de solo. Uma eficiente extração foi obtida quando se fez o uso de 0,5 g da amostra liofilizada dispersa em 1,0 g de florisil, utilizando como cocoluna uma mistura de 0,5 g de florisil e 0,5 g de sílica, e como eluente 6,0 mL de hexano-acetona (1:1). Os extratos foram analisados por HPLC UV-Vis/DAD e as recuperações variaram de 94,3 e 103,9%.

Conha-Graña *et al.*, 2015 [56], desenvolveram e validaram um método de extração por MSPD para a determinação de HPA em musgo. O procedimento consistiu em pesar 0,25 g de amostra e macerar com 0,5 g de C<sub>18</sub>, durante 3 min. Em seguida o macerado foi disposto em um cartucho contendo 1,0 g de florisil e 0,5 g de sulfato de sódio anidro, e então eluído com 10,0 mL de hexano e 10,0 mL de hexano-diclorometano (2:8). O extrato final foi analisado em PTV–GC–MS/MS. Com esse método, a recuperação variou de 77 a 116%.

Pensado *et al.*, 2005 [57], realizaram a extração de HPA por MSPD em tecido de peixe. Eles utilizaram 0,6-0,8 g de amostra dispersa em 2,0 g de C<sub>18</sub> e sulfato de sódio anidro que em seguida era colocada em um cartucho que já continha 2,0 g de florisil e 1,0 g de C<sub>18</sub>. O solvente utilizado para eluição foi a acetonitrila, e em seguida o extrato final foi analisado por HPLC, onde recuperações acima de 80% foram obtidas para todos os compostos analisados.

Ziarrusta *et al.*, 2015 [48], utilizaram a MSPD para extração de HPA em molusco, usando 0,3 g da amostra liofilizada e 0,3 g de florisil que foram

macerados durante 2 minutos em um almofariz. Uma seringa de vidro de 10 mL, contendo um disco de polietileno na parte inferior, foi preenchida com 0,6 g de sílica desativada, 4,0 g de sílica ativada e, posteriormente, o material homogeneizado. Os analitos foram eluídos com 25,0 mL de diclorometano e o extrato foi seco utilizando fluxo de N<sub>2</sub> e reconstituído até um volume final de 140 µL de n-hexano. O extrato final foi analisado por meio de GC/MS.

Campíns-Falcó *et al.*, 2008 [58], extraíram HPA de mexilhões utilizando MSPD, onde 100 mg da amostra liofilizada foi homogeneizada com 0,4 g de C<sub>18</sub> e transferida para um cartucho que continha 0,1 g de florisil, e em seguida eluída com 1,2 mL de acetonitrila, obtendo recuperações na faixa de 52-100%.

### 1.5 Validação de método analítico

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve passar por uma avaliação denominada validação [59]. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados [60].

No Brasil há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), que sugerem que os parâmetros a serem analisados durante um processo de validação de um método sejam seletividade, linearidade, precisão e exatidão, sensibilidade, limite de quantificação e detecção, entre outros. Neste trabalho, os parâmetros avaliados foram a: seletividade, linearidade (em termos de coeficiente de correlação), exatidão (em termos de recuperação), precisão (em termos de coeficiente de variação) limites de detecção e quantificação e robustez.

De um modo geral, pode-se conceituar seletividade como a medida da indiferença do método à presença, na amostra, de espécies que poderiam

interferir na determinação do analito. A espécie de interesse deve ter o sinal analítico isento de interferências que possam levar à confusão na identificação ou dar margem de não confiabilidade ao resultado quantitativo [61].

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Essa faixa é normalmente expressa nas mesmas unidades dos resultados obtidos pelo método. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. Utilizando o método matemático de regressão linear é possível então determinar os coeficientes de regressão  $x$  e  $y$  da curva, assim como o coeficiente de correlação ( $r$ ). Segundo a ANVISA, o valor mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser  $= 0,99$ , pois quanto mais próximo de  $1,0$ , menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados [59-61].

O primeiro passo para a verificação da confiabilidade de uma análise é investigar se a mesma se repete quando operada sequencialmente. A esta operação de repetição denomina-se precisão [61]. Segundo a ANVISA, a precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra em três níveis diferentes de concentrações do analito.

A precisão junto com a exatidão representa a porção mais importante da validação de um método analítico. A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro [59]. Ela é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Todos os parâmetros de uma validação têm o intuito de obter a exatidão [61].

Toda técnica responde com um sinal analítico para uma determinada quantidade de amostra, exposta direta ou indiretamente ao sistema [61]. A menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições

experimentais estabelecidas, é definido como Limite de Detecção (LD) [60]. Já a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas é chamado de Limite de Quantificação (LQ). Tanto o LD quanto o LQ podem ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e pelo método baseado em parâmetros da curva analítica.

A robustez é mais um dos parâmetros avaliados na validação de um método. Ela mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações, como por exemplo mudanças na temperatura ou no pH [59]. Contudo, considerando que os demais parâmetros discriminatórios como linearidade, precisão, entre outros, certifiquem a condição analítica, a robustez deve ser considerada como um alerta da susceptibilidade do método às variações, e não como um parâmetro de aprovação ou rejeição da condição analítica [61].

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Desenvolver um método analítico para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em hepatopâncreas de *Ucides cordatus*, utilizando as técnicas de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

### **2.2 Específicos**

- Otimizar um método cromatográfico para a determinação dos 16 HPA selecionados;

- Desenvolver um método por MSPD avaliando adsorventes comerciais e diferentes solventes de eluição para extração de HPA em hepatopâncreas;
- Validar o método analítico;
- Aplicar o método desenvolvido em amostras de caranguejo-uçá de diferentes regiões de Sergipe;
- Coletar sedimento de mangue e determinar a granulometria e o teor de matéria orgânica presente;
- Determinar as concentrações de HPA presente nos sedimentos superficiais dos mangues utilizando metodologia já validada e correlacioná-las com aquelas encontradas nos caranguejos.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Reagentes e adsorventes**

Os solventes utilizados foram acetonitrila (TEDIA), diclorometano (TEDIA), hexano (TEDIA), de grau de pureza HPLC e hexano (Proquímicos, Brasil) e acetona (Êxodo científica, Brasil), grau PA, para limpeza das vidrarias. Já os adsorventes foram Florisil® 100-200 mesh (Sigma–Aldrich), C<sub>18</sub> 50 µm (Sigma–Aldrich), sulfato de sódio anidro (VETEC, Brasil), sílica-gel 60 (70-230 mesh, Êxodo científica, Brasil) e alumina neutra (70-270 mesh, Sorbtech, sorbent Technologies, EUA).

#### **3.2 Padrões certificados**

Os padrões certificados foram adquiridos nas seguintes concentrações: padrão sub-rogado p-terfenil-D<sub>14</sub> (em diclorometano, 2000 µg mL<sup>-1</sup>), solução conjunta de HPA: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, antraceno, fenantreno, fluoranteno, benzo[a]antraceno, pireno, criseno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[k]fluoranteno, indeno[1,2,3-



cd]pireno e benzo[g,h,i]perileno (em acetonitrila,  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), solução conjunta de padrões internos: naftaleno- $\text{D}_8$ ; acenafteno- $\text{D}_{10}$ ; fenantreno- $\text{D}_{10}$ ; criseno- $\text{D}_{12}$ ; perileno- $\text{D}_{12}$  (em diclorometano,  $4000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Todos os padrões são da marca Cerilliant (Sigma–Aldrich). A partir dos padrões, soluções estoque na concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram preparadas em hexano e armazenadas em freezer. A partir das soluções estoque, foram preparadas novas soluções trabalho nas concentrações de 0,5, 10 e  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  e armazenadas em freezer a  $-18^\circ\text{C}$ , sendo estas utilizadas para fortificar a matriz e preparar as curvas analíticas.

### 3.3 Equipamentos

Balança analítica (Shimadzu, AY220); Banho ultrassônico (Unique, 1400); Centrífuga (EEQ-9904/A); Ultra-freezer UFR30 (Liotop); Liofilizador LJJ04 (JJ Científica); Evaporador rotatório (Fisaton-801); Bomba de vácuo (Fanem, 089-CAL); Sistema para SPE *vacuum manifold* (Varian, Walnut Creek, EUA); Mufla (TC45) ;

Para as determinações cromatográficas foi utilizado um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas, da marca Shimadzu (Quioto, Japão), modelo GCMS-QP2010 Plus, com coluna capilar DB-5MS (5% difenil-95% dimetilpolisiloxano; 30 m x 0,25 mm ID, 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme, J&W Scientific, EUA).

### 3.4 Coleta e armazenamento de amostras

Para a etapa de desenvolvimento e validação do método foram utilizados caranguejos comprados no Mercado Municipal Governador Albano Franco, em Aracaju/SE. Os caranguejos utilizados para a aplicação do método foram coletados em quatro diferentes regiões de mangue de Sergipe (Tabela 6). O sedimento foi também coletado em três pontos adjacentes, o mais

próximo possível da toca do caranguejo-uçá. Para isso foi utilizado potes de vidro previamente limpos, os quais foram levados para o laboratório logo após a coleta. Uma parte do sedimento de cada amostra foi seca por liofilização por um período de 48 h em um recipiente de alumínio. Em seguida, as amostras foram armazenadas em um refrigerador a aproximadamente 4 °C. Os pontos de coleta estão discriminados juntamente com sua coordenada na Tabela 6.

**Tabela 6** - Pontos de amostragem e suas coordenadas.

Pontos	Localização	Coordenadas Geográficas	
		Latitude S	Longitude O
P1	Rio Gameleiro (Abaís, Estância, SE)	11°24.696'	37°20.811'
P2	Rio Vaza-Baris (Orla Pôr-do-sol, Aracaju, SE)	11°05.960'	037°09.193'
P3	Rio Poxim (Aracaju, SE)	10°57.520'	37°3.337'
P4	Rio Sergipe (Jatobá, Barra dos Coqueiros, SE)	10°54.473'	37°1.614'

Já os caranguejos coletados (cerca de seis unidades) foram levados ao laboratório de análise de compostos orgânicos poluentes (LCP-UFS) e o hepatopâncreas foi separado, pesado e armazenado em frasco de vidro previamente limpo e guardado em freezer a aproximadamente -18 °C.

Para o teste de robustez, 2,0 g de hepatopâncreas foi liofilizado por 24 h e em seguida foi feita a extração por MSPD.

### 3.5 Procedimento de preparo de amostras por MSPD

Na etapa de desenvolvimento do método visando a determinação de HPA por MSPD, em um almofariz foi colocado cerca de 0,5 g de hepatopâncreas, que foi fortificado com 25 µL da solução conjunta de HPA 10 µg mL<sup>-1</sup> e 25 µL do padrão sub-rogado p-terfenil-D<sub>14</sub> 10 µg mL<sup>-1</sup>, e um tempo

de 30 min foi esperado para a evaporação do solvente e interação dos padrões com a matriz. Passado esse tempo, juntamente com a amostra fortificada, foram adicionados 1,5 g de florissil e 0,5 g de sulfato de sódio anidro. A amostra foi homogeneizada com um pistilo durante 3 min. O material homogeneizado foi introduzido em uma seringa de vidro de 5 mL previamente preenchida na sua base com lã de vidro silanizada e 0,5 g de C<sub>18</sub>, sendo este adsorvente previamente condicionado com 2 mL de acetonitrila, sem que houvesse a completa secagem.

Em seguida 10 mL de acetonitrila foi eluído, sob vácuo, em um sistema SPE *vacuum manifold*. O extrato foi recolhido em um balão de fundo redondo e levado a um evaporador rotatório (50° C e 80 rpm) até completa secagem, e reconstituído com 1 mL de hexano, sendo o extrato final guardado em um frasco de vidro apropriado. Na etapa de validação, optou-se pelo método de padronização interna, então 100 µL da solução conjunta de padrões interno (0,5 µg mL<sup>-1</sup>) era adicionada ao extrato final. Um microlitro do extrato foi analisado por GC/MS.

Na etapa de aplicação do método nas amostras coletadas, os mesmos passos foram seguidos, com exceção da fortificação da amostra com a solução conjunta de 16 HPA.

### **3.6 Avaliação granulométrica do sedimento**

Após o processo de liofilização, o sedimento foi homogeneizado com a ajuda de um pistilo, e então peneirado em uma peneira de malha de 2 mm, para a retirada de resíduos de folhas, galhos, entre outros. Em seguida cerca de 10 g desse sedimento foi transferido para uma peneira com malha de 0,063 mm e peneirado. A amostra foi separada entre fração fina e grossa, sendo que a fração fina corresponde a silte+argila e a fração grossa corresponde a areia.

### 3.7 Avaliação do teor de matéria orgânica no sedimento

Para avaliar o teor de matéria orgânica presente nas amostras, cerca de 5 g do sedimento liofilizado foi levado a calcinação por um período de 4 h, a uma temperatura de 500 °C. Em seguida, a amostra foi pesada para avaliação da massa perdida. Esse procedimento foi realizado em triplicata e o percentual de material orgânica (% M<sub>ORG</sub>) na amostra foi calculado pela equação 1.

$$\% M_{ORG} = \frac{Mf}{Mi} \times 100 \quad (1)$$

Mi: massa inicial do cadinho + amostra

Mf: massa final após calcinação do cadinho + amostra

### 3.8 Extração e *clean-up* das amostras de sedimento de mangue

Os procedimentos de extração e *clean-up* dos sedimentos foram realizados de acordo com o trabalho de Santos, 2011 [62]. Para a extração, cerca de 5 g do sedimento liofilizado foi pesado em um tubo de ensaio de tampa rosqueável e depois fortificado com 50 µL da solução do padrão subrogado p-terfenil-D<sub>14</sub> 0,5 µg mL<sup>-1</sup>. A amostra foi deixada em repouso por 30 min.

Após a pesagem e fortificação da amostra, foram adicionados 6 mL de diclorometano ao tubo de ensaio, que foi vedado e agitado manualmente para homogeneização do sedimento com o solvente. O tubo de ensaio foi levado para o ultrassom, por um período de 30 min. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por cerca de um minuto, e o sobrenadante foi transferido para um balão de vidro. O procedimento de extração foi realizado mais duas vezes.

Ao extrato obtido foi adicionada uma quantidade de cobre previamente ativado, para que fosse feita a retirada de resíduos de enxofre da amostra que

podem ser coextraídos juntamente com o analito, dificultando e interferindo na análise [75]. O extrato foi levado a um evaporador rotatório (40 °C, 80 rpm, 100 kPa) e reduzido a um volume de aproximadamente 2 mL. Em seguida foi adicionado 8 mL de hexano e novamente concentrado a 2 mL (45 °C, 80 rpm, 500 kPa). Esse extrato foi então levado à etapa de *clean-up*.

Para a etapa de *clean-up*, foi feito o empacotamento de uma coluna de vidro, contendo em sua base lã de vidro e em seguida uma quantidade de sulfato de sódio anidro, 1 g de alumina, 2 g de sílica-gel e novamente sulfato de sódio anidro, nesta ordem. Estes adsorventes foram previamente calcinados a 400 °C por um período de 4 h. Antes do empacotamento da coluna, tanto a alumina como a sílica-gel foram desativadas a 2% e 5% respectivamente, com água ultra-pura.

O procedimento do empacotamento das colunas foi realizado da seguinte forma:

- Lavar a coluna de vidro com diclorometano;
- Adicionar uma quantidade de lã de vidro a base da coluna e lavar com diclorometano, deixando esse solvente ser escoado;
- Adicionar um pequeno volume de diclorometano e em seguida o sulfato de sódio anidro para nivelar a base da coluna;
- Adicionar cuidadosamente 1 g de alumina neutra desativada a 2% na coluna, mantendo a torneira fechada;
- Homogeneizar a sílica-gel desativada a 5% com diclorometano em um béquer para a formação de um gel e lentamente adicionar na coluna com a torneira aberta;
- Adicionar uma quantidade de sulfato de sódio anidro, e escoar o excesso de solvente até o nível do sulfato;
- Após eluir todo o diclorometano, adicionar 5 mL de hexano com o intuito de preparar a coluna para receber o extrato.

Após a montagem da coluna, o extrato foi adicionado com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, lavando o balão mais duas vezes com hexano e adicionando na coluna. Em seguida foi realizado a eluição do extrato com 8 mL

de hexano, o qual obtinha-se a fração 1 (F1). Logo após foi eluído 20 mL de diclorometano/hexano (1:1, v/v), para obtenção da fração 2 (F2) que contém os HPA.

Estas frações foram concentradas em evaporador rotatório (45 °C, 80 rpm) até um volume de aproximadamente 1 mL, e em seguida uma solução conjunta de padrões internos de HPA foi adicionada a F2, a qual foi armazenada em frasco de vidro e levada para análise cromatográfica.

### 3.9 Preparo das curvas analíticas

Para obtenção das curvas analíticas, foram utilizadas soluções conjunta de HPA, do padrão sub-rogado p-terfenil-D<sub>14</sub> e da solução conjunta de padrões internos. As soluções trabalho nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 ng mL<sup>-1</sup> foram preparadas em hexano e no extrato da matriz (Tabela 7).

**Tabela 7** - Concentrações e volume das soluções utilizadas para o preparo das curvas analíticas.

Pontos da curva analítica	Padrão sub-rogado p-terfenil-D <sub>14</sub>	Volume	Solução conjunta de HPA	Volume	Padrão Interno	Volume
[ ] ng mL <sup>-1</sup>	[μg mL <sup>-1</sup> ]	μL	[μg mL <sup>-1</sup> ]	μL	[μg mL <sup>-1</sup> ]	μL
5	0,5	10	0,5	10	0,5	100
10	0,5	20	0,5	20	0,5	100
25	0,5	50	0,5	50	0,5	100
50	0,5	100	0,5	100	0,5	100
100	10	10	10	10	0,5	100

A obtenção das curvas analíticas foi realizada com o auxílio do programa GCMSsolution, utilizando o método de mínimos quadrados. A relação entre a razão da área do analito pela área do padrão interno e a concentração de HPA foi utilizada para estimar os coeficientes angular, linear e de correlação (r).

### 3.10 Condições cromatográficas de análise

As determinações dos HPA foram realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas, da marca Shimadzu, modelo GC/MS-QP2010 plus, com a programação de temperatura e condições cromatográficas apresentadas na Tabela 8:

**Tabela 8** - Condições cromatográficas utilizadas nas análises.

Parâmetros	Condições
Temperatura do injetor	300 °C
Temperatura da interface	300 °C
Fonte de íons	280 °C
Gás de arraste	Hélio (99,995%)
Vazão do gás de arraste	1,2 mL min <sup>-1</sup>
Modo de Injeção	Splitless por 1 min
Volume da injeção	1 µL
Modo de operação do espectrômetro de massas	Modo SIM, com ionização por elétrons (70 eV)
Programação de temperatura	40 °C com 2 min de isoterma, 40-100 °C a 35 °C min <sup>-1</sup> , 100-260 °C a 8 °C min <sup>-1</sup> , com isoterma de 1 min, 260-310 °C a 9 °C min <sup>-1</sup> , com isoterma de 10 min

Os compostos de interesse (16 HPA, padrões internos e padrão subrogado) foram analisados pelos íons de identificação e quantificação, além do tempo de retenção ( $t_R$ ) de soluções padrão certificadas no GC/MS. Os HPA foram divididos em cinco grupos de acordo com seu respectivo padrão interno (Tabela 9).

**Tabela 9** - Tempo de retenção, íons para identificação e quantificação dos HPA, padrões internos e padrão sub-rogado p-terfenil-D<sub>14</sub>.

Composto	t <sub>R</sub> (min)	íons de quantificação (m/z)	íons de identificação (m/z)	Padrão interno
Naftaleno	7,758	128	127	Naftaleno-D <sub>8</sub>
Naftaleno-D <sub>8</sub>	7,721	-	136	
Acenaftileno	11,553	152	153	Acenafteno-D <sub>10</sub>
Acenafteno	12,029	154	153	Acenafteno-D <sub>10</sub>
Fluoreno	13,490	166	165	Acenafteno-D <sub>10</sub>
Acenafteno-D <sub>10</sub>	11,945	-	164	
Fenantreno	16,246	178	176	Fenantreno-D <sub>10</sub>
Antraceno	16,395	178	176	Fenantreno-D <sub>10</sub>
Fluoranteno	19,750	202	200	Fenantreno-D <sub>10</sub>
Fenantreno-D <sub>10</sub>	16,186	-	188	
Pireno	20,391	202	200	Criseno-D <sub>12</sub>
Padrão sub-rogado p-terfenil-D <sub>14</sub>	21,070	244	-	Criseno-D <sub>12</sub>
Benzo[a]antraceno	24,013	228	226	Criseno-D <sub>12</sub>
Criseno	24,114	228	226	Criseno-D <sub>12</sub>
Criseno-D <sub>12</sub>	24,033	-	240	
Benzo[b]fluoranteno	27,343	252	250	Perileno-D <sub>12</sub>
Benzo[k]fluoranteno	27,426	252	250	Perileno-D <sub>12</sub>
Benzo[a]pireno	28,207	252	250	Perileno-D <sub>12</sub>
Indeno[1,2,3-cd]perileno	30,878	276	274	Perileno-D <sub>12</sub>
Dibenzo[a,h]antraceno	30,956	278	274	Perileno-D <sub>12</sub>
Benzo[g,h,i]perileno	31,479	276	274	Perileno-D <sub>12</sub>
Perileno-D <sub>12</sub>	28,360	-	264	



### **3.11 Limpeza de materiais**

#### *3.11.1 Vidrarias comuns*

As vidrarias foram enxaguadas com água corrente e detergente neutro. Após a lavagem foi usada água destilada e posteriormente acetona. Após completa secagem da vidraria foi passado hexano. A secagem desse material foi feita em estufa com exceção das volumétricas. Os materiais foram cobertos com papel alumínio e guardados.

#### *3.11.2 Descontaminação dos materiais de extração*

Os materiais usados nas extrações, como seringas de vidro, balões de fundo chato e pipetas, foram preenchidos com água e detergente e levados para o ultrassom por 30 min. Posteriormente, foi feita a lavagem com água corrente, água destilada e acetona. A secagem desse material foi feita em estufa, e após a secagem era lavado com hexano. Os materiais foram cobertos com papel alumínio e guardados.

### **3.12 Descarte de resíduos**

Os resíduos de solventes orgânicos foram descartados em frascos de vidro distintos para cada solvente, devidamente etiquetados, não havendo mistura entre eles.

Os resíduos sólidos provenientes das extrações foram descartados em frascos de plástico, previamente identificados.

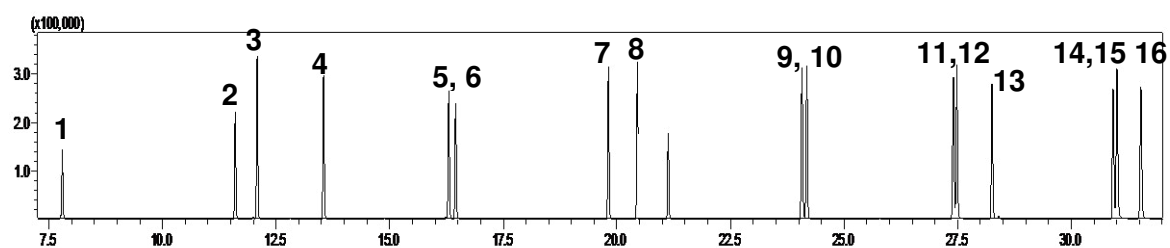
Os resíduos sólidos e líquidos são levados para serem incinerados por uma empresa responsável.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Otimização do método cromatográfico

Para a otimização do método cromatográfico foi analisada uma solução conjunta de HPA com concentração de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  em hexano no modo SCAN, para a obtenção dos tempos de retenção, íons de identificação e quantificação (Apêndice D). Posteriormente, foi feita a análise dos 16 HPA selecionando seus íons característicos no modo SIM (*Selected Ion Monitoring*) (Figura 6). A seleção dos fragmentos monitorados e os tempos de retenção dos 16 HPA estão relacionados na Tabela 9.

**Figura 6** - Cromatograma de íons totais obtido por CG/MS (modo SIM) da solução conjunta de HPA  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ .



(1) naftaleno, (2) acenaftileno, (3) acenafteno, (4) fluoreno, (5) fenantreno, (6) antraceno, (7) fluoranteno, (8) pireno, (9) benzo[a]antraceno, (10) criseno, (11) benzo[b]fluoranteno, (12) benzo[k]fluoranteno, (13) benzo[a]pireno, (14) indeno[1,2,3-cd]pireno, (15) dibenzo[a,h]antraceno, (16) benzo[g,h,i]perileno.

### 4.2 Desenvolvimento da metodologia de preparo da amostra por MSPD

Para o desenvolvimento do método, foi utilizada a padronização externa, em que a recuperação do padrão sub-rogado p-terfenil- $\text{D}_{14}$  (1,4-difenilbenzeno) foi o parâmetro avaliado. O padrão sub-rogado é definido como um composto ou elemento puro adicionado ao material teste, no qual o comportamento químico e físico é representativo da substância de interesse [59].

Os testes foram realizados fortificando 0,5 g do hepatopâncreas com 25 µL da solução padrão sub-rogado 10 µg mL<sup>-1</sup>, seguido do processo de extração. As áreas dos picos cromatográficos oriundos dos extratos fortificados e extratos de comparação (branco) foram usadas para determinar a recuperação pela equação 2.

$$\text{Recuperação (\%)}: \frac{\text{valor obtido}}{\text{valor esperado}} \times 100 \quad (2)$$

#### 4.2.1 Seleção do adsorvente e solvente de extração

O suporte sólido empregado na técnica de MSPD possui várias funções e a seletividade está diretamente relacionada com a combinação entre este e o solvente de eluição empregado [63]. A escolha dos adsorventes se deu com base na literatura, cujos trabalhos utilizaram com frequência o florisil e C<sub>18</sub> para extração de HPA de diversas matrizes [55-57].

Um dos principais obstáculos na análise de amostras biológicas é a interferência causada por lipídeos e proteínas. O caráter lipofílico de materiais de fase reversa como o C<sub>18</sub> facilita a retenção de compostos lipídicos. Para a extração de analitos a partir de tecidos animais, C<sub>18</sub> é o adsorvente mais utilizado [63]. O florisil é usado geralmente como dispersante para amostras semissólidas, sendo muito utilizado para a remoção de coextrativos como lipídeos [40, 55].

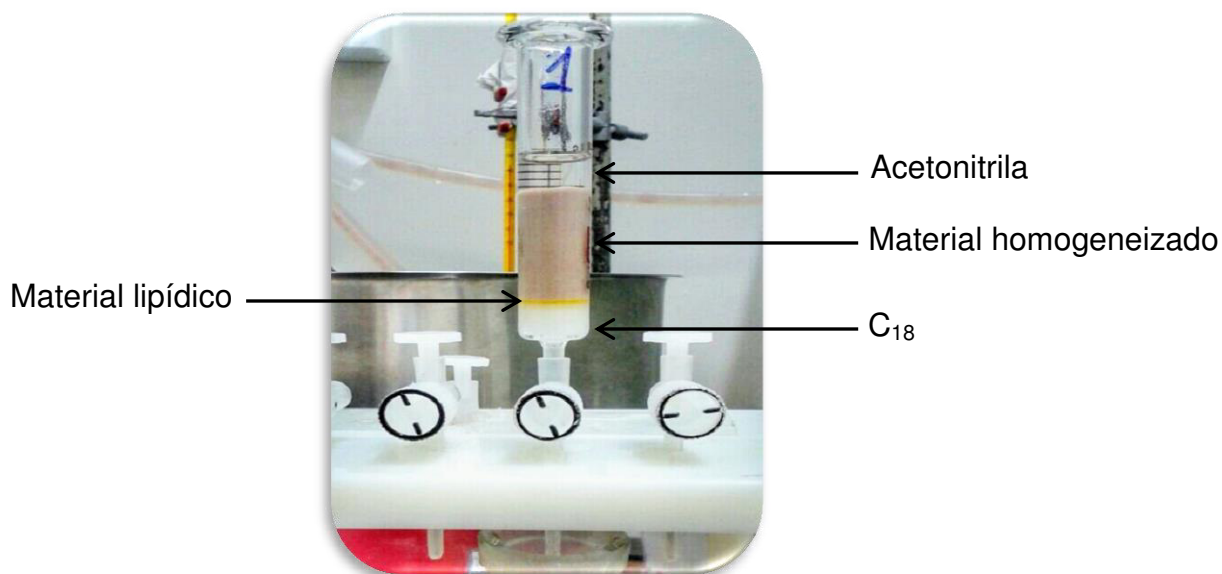
Foram avaliados esses dois adsorventes, em uma proporção baseada em um trabalho realizado por Souza *et al.*, 2013 [44], que utilizaram a técnica de MSPD para extração de agrotóxicos em ovos de galinha. Foram utilizados 1,5 g de florisil como dispersante e 0,5 g de C<sub>18</sub> como adsorvente auxiliar. Além disso, a possibilidade de secagem da amostra com sulfato de sódio anidro foi considerada, pois a presença de água durante o empacotamento e a eluição da amostra pode dificultar estas etapas [31]. Pensado *et al.*, 2005 [57], ao testar C<sub>18</sub> e florisil como adsorventes para extração de HPA em peixe, perceberam que a utilização de sulfato de sódio anidro para secar a amostra foi um fator

significativo para melhorar a capacidade de ambos os adsorventes em reter o material lipofílico.

O solvente escolhido primeiramente foi a acetonitrila, devido ao fato deste reduzir a coextração de lipídeos e de açúcares, uma vez que não os dissolvem [40]. Este solvente também foi utilizado para a extração de HPA por MSPD em outros trabalhos [57, 64, 65].

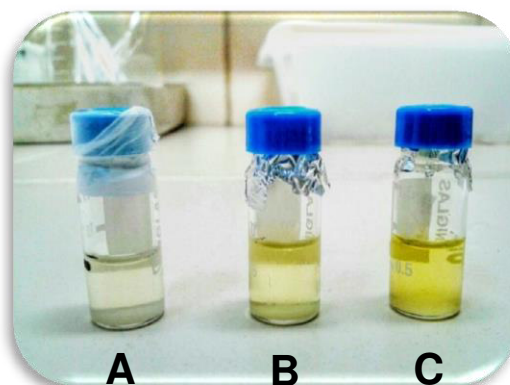
Os testes foram realizados em duplicata, utilizando o padrão sub-rogado p-terfenil-D<sub>14</sub>, com nível de fortificação 0,5 µg g<sup>-1</sup>, 0,5 g do hepatopâncreas, 1,5 g de florisil como dispersante juntamente com 0,5 g de sulfato de sódio anidro, 0,5 g de C<sub>18</sub> como adsorvente auxiliar e 10 mL de acetonitrila como solvente de eluição (Figura 7). A recuperação média do padrão sub-rogado obtida foi de 93 ± 6%, indicando a eficiência do método.

**Figura 7** - Esquema da montagem da coluna de extração por MSPD.



Foram testados outros solventes descritos na literatura para extração de HPA, como diclorometano e hexano, utilizando 10 mL de cada um. Contudo, o extrato final apresentou coextração de material lipídico presente no hepatopâncreas. Desta forma, estes foram descartados como possíveis solventes de eluição (Figura 8).

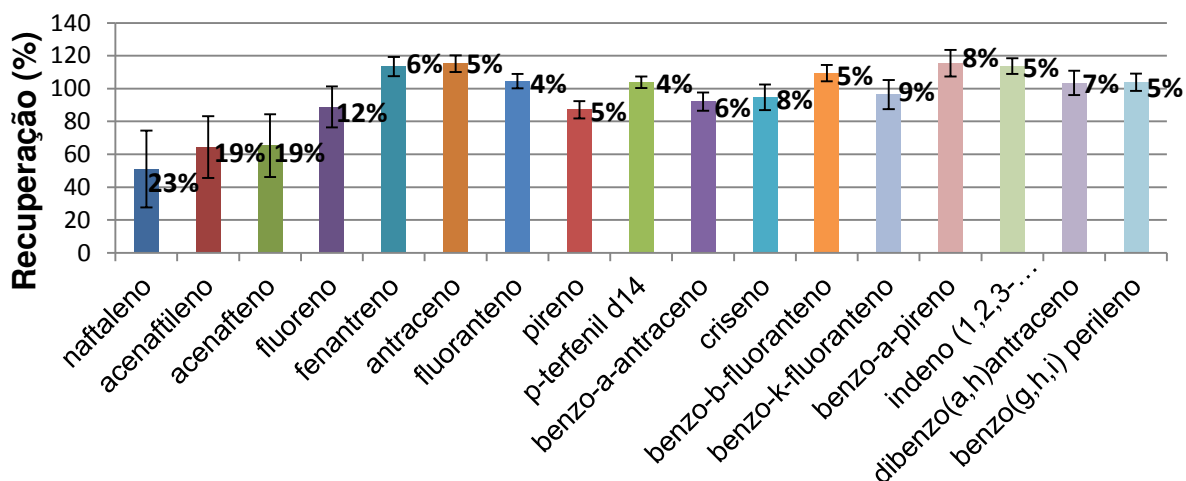
**Figura 8** - Extrato final utilizando como solvente de extração A) acetonitrila, B) hexano e C) diclorometano.



Utilizando a mesma massa da amostra e adsorventes, um novo teste foi feito diminuindo o volume da acetonitrila para 5 mL. A recuperação do padrão sub-rogado foi de apenas  $22 \pm 3\%$ , a qual está muito abaixo do recomendado. Sendo assim, 10 mL foi escolhido como o volume ótimo.

Outro ensaio com o padrão sub-rogado e a solução conjunta de 16 HPA foi realizado para o estudo de suas recuperações individuais. As mesmas condições de extração foram utilizadas: 0,5 g da amostra, 1,5 g de florisil como dispersante juntamente com 0,5 g de sulfato de sódio anidro, como adsorvente auxiliar 0,5 g de  $C_{18}$  e 10 mL de acetonitrila como solvente de eluição. As recuperações ficaram no intervalo recomendado de 60-120% (Figura 9) para a maioria dos HPA, com coeficientes de variação entre 4-19%. Os valores de recuperação mais baixos dos três primeiros HPA, naftaleno, acenaftileno e acenafteno, podem estar relacionados a evaporação completa do extrato no rotaevaporador. Ferreira *et al.*, 2012 [66], verificaram que com a secagem completa do solvente a recuperação percentual de HPA variou de 2 a 82%. Uma grande perda dos compostos, em particular para HPA com pressão de vapor mais elevada, tais como naftaleno, acenaftileno e acenafteno, foi observada.

**Figura 9** - Gráfico das recuperações médias ( $n=3$ ) dos HPA, do padrão substituído p-terfenil- $D_{14}$  e seus respectivos coeficientes de variação, com nível de fortificação  $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ .



Não foi testada outra proporção matriz/suporte, visto que a primeira proporção utilizada, 1:3 (m:m), mostrou bons resultados. Dórea, 2015 [41], menciona que um critério prático a ser adotado é que a mistura homogeneizada esteja pulverulenta e não pastosa, o que permitirá a melhor penetração do eluente no material. Com base nesse critério, o hepatopâncreas que é inicialmente pastoso, ficou com o aspecto de pó quando macerado com o florisil (Figura 10). Geralmente a razão matriz/suporte varia de 1:1 a 1:4 [40], sendo a razão utilizada neste trabalho incluída nesse intervalo.

**Figura 10** - Aspecto do material homogeneizado.



### 4.3 Validação do método analítico

#### 4.3.1 Linearidade e sensibilidade

A verificação da linearidade numa curva de resposta pode ser feita em função do coeficiente de correlação ( $r$ ). A ANVISA [60] recomenda um coeficiente de correlação de no mínimo 0,99, enquanto que o INMETRO [67] aceita valores acima de 0,90. Para a faixa linear utilizada ( $5\text{-}100\text{ ng mL}^{-1}$ ) todos os HPA mostraram valores de coeficiente de correlação ( $r$ ) acima dos valores aceitos tanto pelo INMETRO quanto pela ANVISA (Tabela 10), indicando que há uma menor dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados [59].

Com relação ao coeficiente angular, que expressa a inclinação da curva, quanto maior for o seu valor maior será a variação do sinal ( $y$ ) em relação a pequenas variações de concentração. Ou seja, quanto maior o valor do coeficiente angular, maior a sensibilidade do método [68]. Considerando a curva preparada no solvente, pode-se dizer que o HPA acenaftileno apresentou o maior coeficiente angular (2,1944), demonstrando uma maior sensibilidade de resposta, enquanto que o indeno[1,2,3-cd]perileno mostrou uma menor sensibilidade, com um valor de coeficiente angular de 0,4323. Para a curva preparada no extrato da matriz, o acenaftileno continuou sendo o HPA com maior sensibilidade de resposta, e o pireno foi o que obteve menor coeficiente angular (0,7226).

Na etapa de aplicação do método foram utilizadas outras curvas analíticas que são apresentadas na Tabela 1 do Apêndice A.

**Tabela 10** - Equações da reta das curvas analíticas dos 16 HPA no solvente e no extrato da matriz e seus coeficientes de correlação (r).

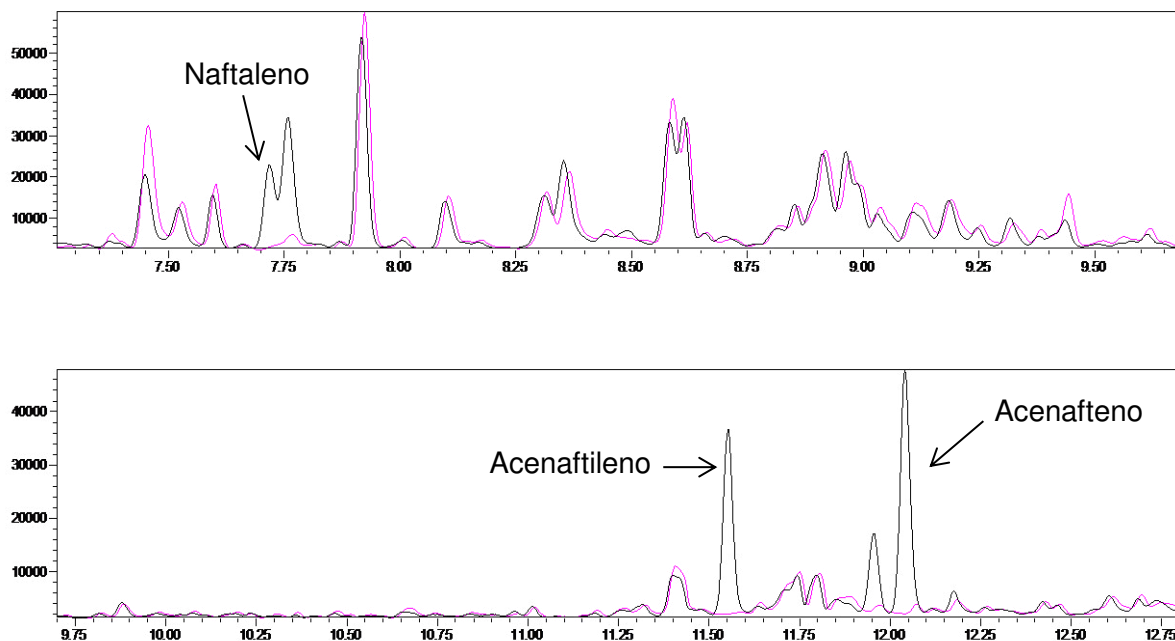
HPA	Curva no solvente		Curva no extrato da matriz	
	Equação da reta	r	Equação da reta	r
Naftaleno	$y=0,8087x + 0,0160$	0,9999	$y=0,7342x + 0,1109$	0,9990
Acenaftileno	$y= 2,1944x + 0,0093$	0,9995	$y=2,2409x + 0,0939$	0,9991
Acenafteno	$y=1,6346x + 0,0086$	0,9995	$y=1,4197x + 0,0971$	0,9998
Fluoreno	$y=1,3695x - 0,0154$	0,9996	$y=1,3411x + 0,08877$	0,9992
Fenantreno	$y=1,1031x - 0,0110$	0,9998	$y=1,1181x + 0,0833$	0,9988
Antraceno	$y= 0,9835x - 0,0044$	0,9997	$y=1,0053x + 0,0617$	0,9992
Fluoranteno	$y=1,2621x - 0,0001$	0,9999	$y=1,2082x + 0,0873$	0,9986
Pireno	$y=1,1032x - 0,0041$	0,9992	$y=0,7226x + 0,0597$	0,9991
Benzo[a]antraceno	$y=1,0188x - 0,0146$	0,9999	$y=1,1490x + 0,0575$	0,9998
Criseno	$y= 1,1632x + 0,0168$	0,9999	$y=1,1002x + 0,0888$	0,9993
Benzo[b]fluoranteno	$y=1,1066x - 0,0343$	0,9998	$y=1,0993x + 0,0480$	0,9994
Benzo[k]fluoranteno	$y= 1,4163x - 0,0529$	0,9993	$y=1,0993x + 0,0480$	0,9996
Benzo[a]pireno	$y=1,0368x - 0,0321$	0,9998	$y=0,93509x + 0,0934$	0,9991
Indeno[1,2,3-cd]perileno	$y= 0,4323x - 0,0095$	0,9983	$y=0,8305x + 0,0059$	0,9997
Dibenzo[a,h]antraceno	$y=0,4746x - 0,0153$	0,9994	$y= 0,8841x + 0,0267$	0,9991
Benzo[g,h,i]perileno	$y=0,6624x - 0,0171$	0,9990	$y= 0,9352x + 0,0346$	0,9998

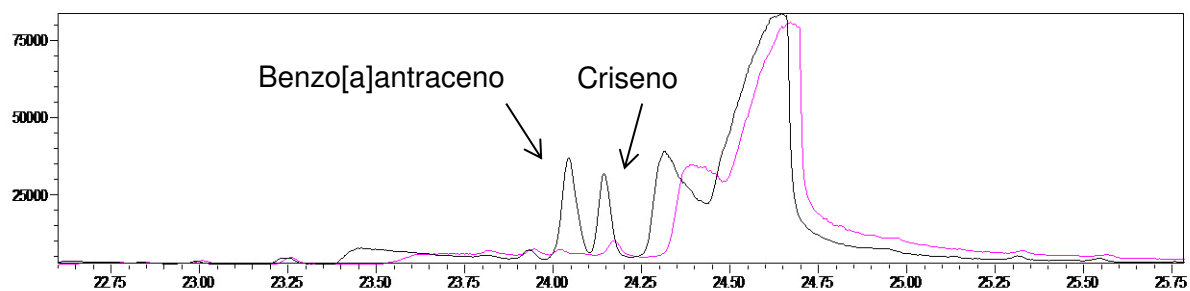
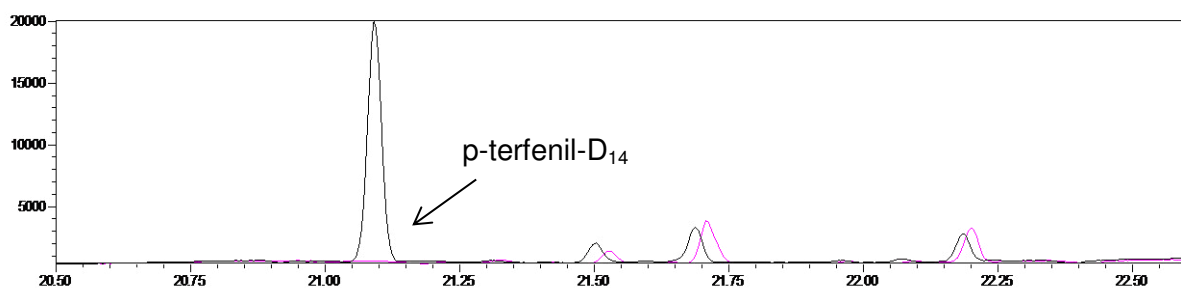
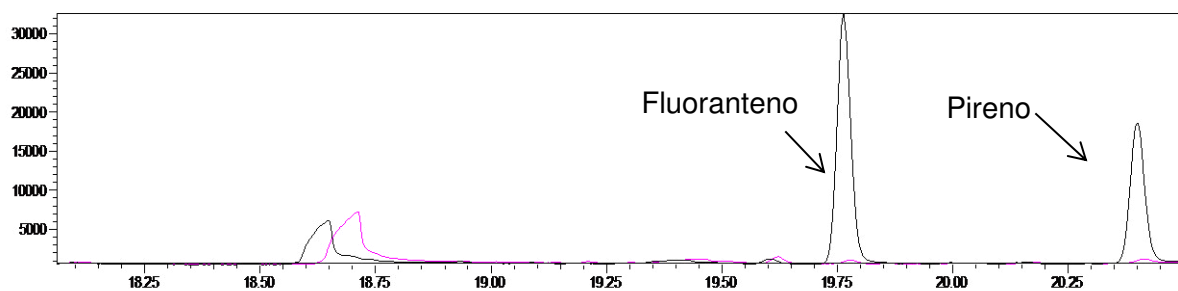
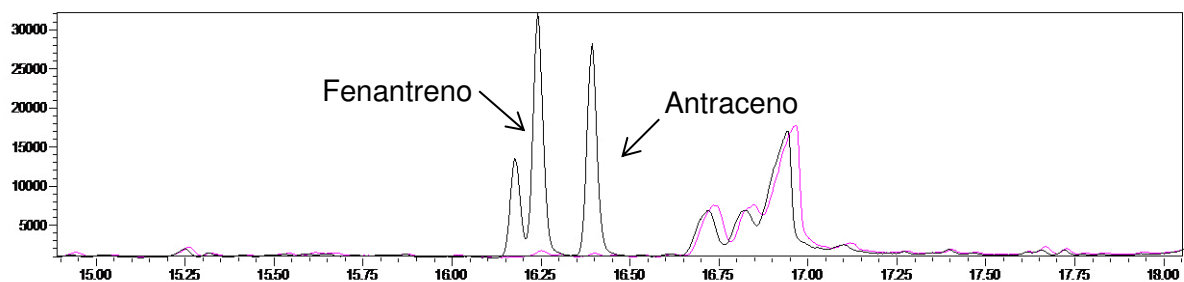
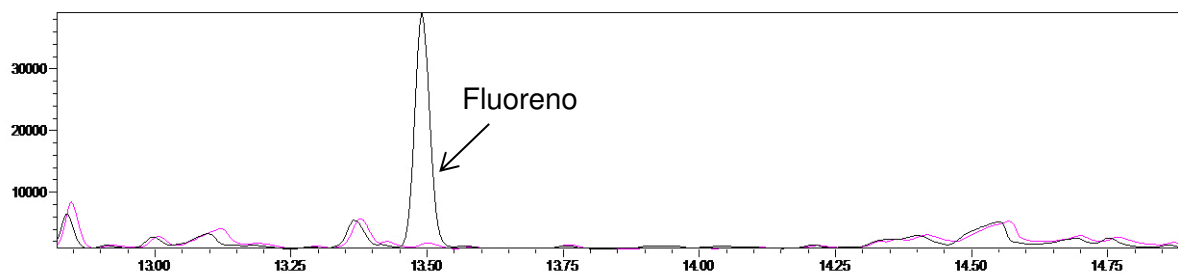


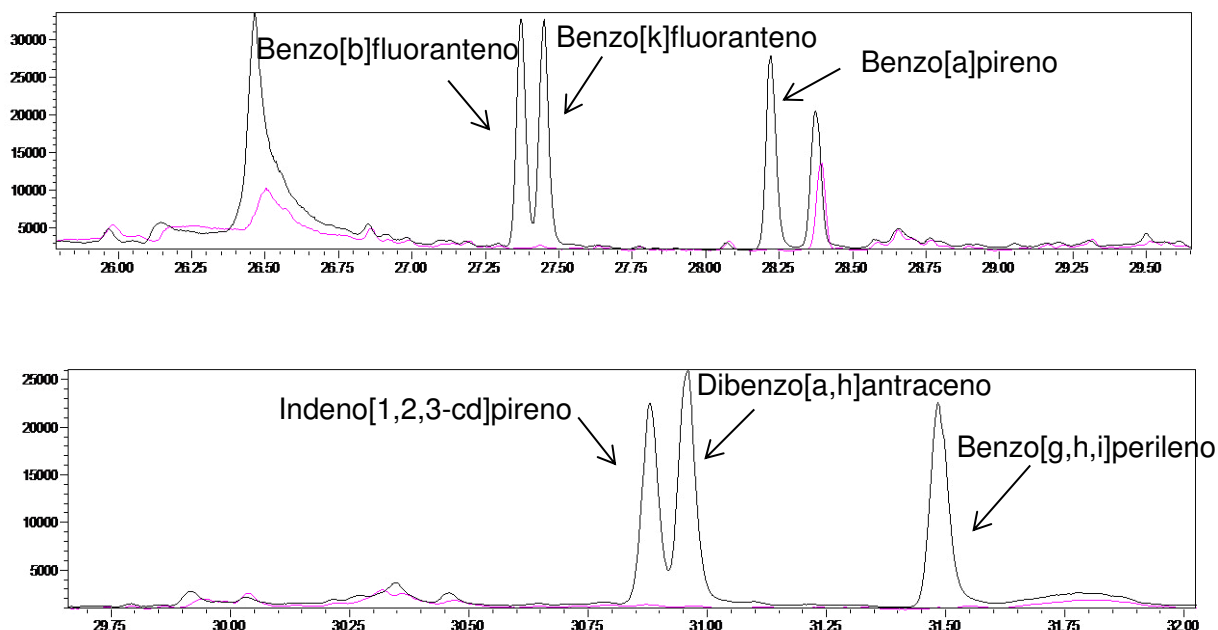
#### 4.3.2 Seletividade

A seletividade corresponde a capacidade de um método determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias interferentes. Em geral, uma forma simples de verificar a seletividade de um método cromatográfico é observar a presença de picos na região do tempo de retenção do analito de interesse, comparando a amostra controle da matriz (branco) com o extrato fortificado [69, 70]. Com base nisso, o método se mostrou seletivo para os 16 HPA testados, não ocorrendo coeluição dos analitos com compostos da matriz, conforme mostrado nos cromatogramas da Figura 11:

**Figura 11** - Cromatogramas obtidos por GC/MS no método SIM: (ROSA) extrato controle da amostra (branco); (PRETO) extrato da matriz fortificado com a solução conjunta de HPA na concentração de 100 ng mL<sup>-1</sup>







#### 4.3.2.1 Análise do efeito matriz

Durante as análises cromatográficas, os componentes da matriz contidos nos extratos podem influenciar na quantificação dos analitos de interesse, gerando resultados duvidosos. Esse fenômeno, também conhecido como “aumento da resposta cromatográfica induzida pela matriz”, é usado para explicar as taxas de recuperação que excedem 100% e a baixa precisão de resultados.

O efeito matriz é mais pronunciado em análises de amostras complexas, como frutas, vegetais, mel, sucos, vinhos, óleo de oliva, tecidos animais, leite humano, solos, entre outros [71]. O efeito de matriz, além de gerar porcentagens de recuperação superiores a 100%, pode causar outras alterações na análise cromatográfica, como mascaramento do pico do analito de interesse e erro na identificação do analito. A cromatografia gasosa é mais susceptível ao efeito matriz, devido ao fato da introdução da amostra no aparelho ser acompanhada por sua vaporização, ficando exposta no injetor a uma temperatura alta e por tempo suficiente para que sítios ativos do insertor (*liner* ou tubo de vidro) do injetor adsorvam ou induzam à degradação térmica de alguns analitos, antes de serem transferidos para a coluna. Uma estratégia

aparentemente adequada para contornar o problema criado pela presença dos sítios ativos no injetor é o mascaramento intencional deles. Nesta técnica, as soluções padrão são adicionadas no extrato da matriz e analisadas. Dessa forma, os próprios componentes da matriz ocupam os sítios ativos durante a análise do padrão, assim como ocorre nas análises dos extratos.

Para a avaliação do efeito matriz foi feita uma curva analítica com adição da substância de interesse no extrato da matriz e comparada com uma curva analítica preparada no solvente de injeção (n-hexano). A razão entre os coeficientes angulares (extrato da matriz e solvente) indica o erro associado ao efeito matriz para cada HPA. Quando a razão foi superior a 1,0 o efeito matriz foi positivo, enquanto que valor inferior a 1,0 indica efeito matriz negativo [72].

Como pode-se observar na Tabela 11, para os HPA acenaftileno, fenantreno, antraceno, benzo[a]antraceno, indeno[1,2,3-cd]perileno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno, o valor da razão dos coeficientes angulares foi maior do que 1,0, caracterizando assim que houve um efeito de matriz positivo, gerando um aumento do sinal do analito. Ao passo que para os demais HPA os valores encontrados são abaixo de 1,0, indicando um efeito matriz negativo, ou seja, uma supressão do sinal.

Portanto as quantificações dos HPA foram realizadas utilizando a curva analítica preparada no extrato da matriz.

**Tabela 11** - Razão dos coeficientes angulares (extrato/solvente).

HPA	Razão dos Coeficientes angulares	HPA	Razão dos Coeficientes angulares
Naftaleno	0,91	Benzo[a]antraceno	1,13
Acenaftileno	1,02	Criseno	0,94
Acenafteno	0,87	Benzo[b]fluoranteno	0,99
Fluoreno	0,98	Benzo[k]fluoranteno	0,77
Fenantreno	1,01	Benzo[a]pireno	0,90

Antraceno	1,02	Indeno[1,2,3-cd]perileno	1,92
Fluoranteno	0,96	Dibenzo[a,h]antraceno	1,86
Pireno	0,65	Benzo[g,h,i]perileno	1,41

#### 4.3.3 Exatidão e Precisão

A exatidão foi avaliada por meio da análise em triplicata de amostras fortificadas de hepatopâncreas em três diferentes níveis de concentração, contemplando o intervalo linear da curva, como proposto pela Resolução RE nº 899, da ANVISA.

A precisão pode ser determinada em condições de repetibilidade ou em condições de reprodutibilidade. Nesse trabalho foi realizado ensaios na condição de repetibilidade, usando o mesmo método, na mesma amostra, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento, sendo os ensaios realizados no mesmo dia (intradia) [69]. A precisão foi medida por meio do coeficiente de variação (C.V).

Os testes foram realizados utilizando os níveis de fortificação 0,02, 0,05 e 0,1  $\mu\text{g g}^{-1}$  (10, 25 e 50  $\text{ng mL}^{-1}$ ), sendo estes os pontos intermediários da curva analítica. A Tabela 12 mostra os valores obtidos para os testes de exatidão e precisão.

Para o naftaleno, as recuperações foram consideradas insatisfatórias para todos os níveis de fortificação testados, assim como para o acenaftileno e o acenafteno nos dois primeiros níveis. Esses baixos valores já eram esperados, uma vez que na otimização do método estes HPA já apresentaram recuperações baixas. Como já mencionado, esses valores podem estar relacionados à perda por evaporação total do extrato no rotaevaporador.

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$ . Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50

a 120% [58, 64]. Em todos os níveis de fortificação, o padrão sub-rogado p-terfenil-D<sub>14</sub> e os demais treze HPA fluoreno, antraceno, fenantreno, fluoranteno, benzo[a]antraceno, pireno, criseno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[k]fluoranteno, indeno[1,2,3-cd]pireno e benzo[g,h,i]perileno, apresentaram valores de recuperação no intervalo entre 60-111 % e coeficientes de variação inferiores a 20%, mostrando que o método apresenta ótima exatidão e precisão.

Falco *et al.*, 2008 [64], ao extraírem HPA de mexilhões por MSPD, alcançou valores de recuperação que variaram entre 52 a 100% . Pena *et al.*, 2008 [73], utilizando a técnica de MSPD para extração de HPA em lodo de esgoto, obteve recuperações na faixa de 76,3-103,6%. Concha-Graña *et al.*, 2015 [56], utilizando também a MSPD para extração de HPA em musgo, alcançou recuperações que variaram de 77-116%. Os resultados obtidos neste trabalho são então comparáveis com outros que também utilizaram a mesma técnica de extração e analito, indicando que o método apresenta exatidão adequada para a determinação de HPA em hepatopâncreas de caranguejo-uçá.

**Tabela 12** - Resultados de recuperação e coeficientes de variação para os três níveis de fortificação testados.

	Fortificação de 0,02 $\mu\text{g g}^{-1}$		Fortificação de 0,05 $\mu\text{g g}^{-1}$		Fortificação de 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$	
	Rec. (%)	C.V. (%)	Rec. (%)	C.V. (%)	Rec. (%)	C.V. (%)
HPA						
Naftaleno	29	46	7	36	12	8
Acenaftileno	46	6	41	3	61	2
Acenafteno	55	22	42	16	64	3
Fluoreno	68	6	60	5	76	2
Fenantreno	99	19	85	4	89	2
Antraceno	74	5	81	1	88	1
Fluoranteno	92	19	94	3	93	2
Pireno	111	15	105	8	103	4
Padrão sub-rogado p-terfenil-D <sub>14</sub>	94	16	79	2	94	8
Benzo[a]antraceno	99	10	83	13	92	3
Criseno	73	16	78	9	89	6
Benzo[b]fluoranteno	86	8	85	3	90	2
Benzo[k]fluoranteno	81	10	86	3	88	1
Benzo[a]pireno	75	4	82	1	93	2
Indeno[1,2,3-cd]perileno	78	17	78	3	92	2
Dibenzo[a,h]antraceno	72	17	76	5	92	7
Benzo[g,h,i]perileno	84	13	77	5	94	8

Rec (%): Recuperação média (n=3); C.V.: coeficiente de variação.

#### 4.3.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Neste trabalho, para a avaliação do LD, foi utilizado o método visual, com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse no extrato da matriz, de tal modo que se possa distinguir entre ruído e o sinal analítico pela visualização da menor concentração detectável. Já o LQ foi calculado multiplicando o LD por um fator de 3,3 [60]. Na Tabela 13 constam os valores encontrados de LD e LQ para cada HPA testado:

**Tabela 13** - Limite de detecção e quantificação dos HPA estudados.

HPA	LD (ng g <sup>-1</sup> )	LQ (ng g <sup>-1</sup> )	HPA	LD (ng g <sup>-1</sup> )	LQ (ng g <sup>-1</sup> )
Naftaleno	0,2	0,6	Benzo[a]antraceno	2,0	6,6
Acenaftileno	1,4	4,6	Criseno	2,0	6,6
Acenafteno	1,0	3,2	Benzo[b]fluoranteno	2,0	6,6
Fluoreno	0,2	0,6	Benzo[k]fluoranteno	2,0	6,6
Fenantreno	2,6	8,6	Benzo[a]pireno	3,0	9,8
Antraceno	2,6	8,6	Indeno[1,2,3-cd]perileno	2,0	6,6
Fluoranteno	0,2	0,6	Dibenzo[a,h]antraceno	3,0	9,8
Pireno	0,2	0,6	Benzo[g,h,i]perileno	2,0	6,6

#### 4.2.5 Robustez

A robustez pode ser analisada frente a pequenas alterações do método, como por exemplo, temperatura, pH, velocidade do fluxo, composição da amostra, entre outros. Essas alterações podem ser feitas individualmente (método univariado) ou simultaneamente (método multivariado) [61, 65] Neste trabalho foi testado a variação da composição da amostra. A robustez foi avaliada através da recuperação, utilizando o método de padronização externa,



com nível de fortificação  $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ . Dois procedimentos diferentes foram testados:

- ✓ Teste A: o primeiro consistiu em manter os mesmos parâmetros de extração por MSPD já otimizados (1,5 g de florisil, 0,5 g de  $\text{C}_{18}$ , 0,5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 10 mL de ACN), usando 0,5 g da amostra liofilizada;
- ✓ Teste B: o segundo teste, consistiu em não utilizar 0,5 g de sulfato de sódio no momento da maceração com a matriz, mas na coluna, fazendo uso também da amostra liofilizada. Os dois testes foram realizados em triplicata.

Os valores obtidos de recuperação para a maioria dos HPA (Tabela 14) encontram-se dentro dos intervalos aceitos de 60-120% e os coeficientes de variação menores do que 20%, com exceção apenas do naftaleno. Sendo assim, o método se mostrou robusto para as condições testadas.

**Tabela 14** - Recuperações médias (n=3) e coeficientes de variação obtidos no teste de robustez.

	TESTE A		TESTE B	
	Rec. (%)	C.V. (%)	Rec. (%)	C.V. (%)
HPA				
Naftaleno	52	12	18	13
Acenaftileno	76	10	64	10
Acenafteno	90	11	64	10
Fluoreno	83	13	79	8
Fenantreno	86	13	89	6
Antraceno	72	15	88	5
Fluoranteno	69	14	84	4
Pireno	77	12	77	4
Padrão sub-rogado p-terfenil-D <sub>14</sub>	74	16	86	8
Benzo[a]antraceno	108	16	73	5
Criseno	107	18	78	4
Benzo[b]fluoranteno	89	15	83	6
Benzo[k]fluoranteno	90	15	83	7
Benzo[a]pireno	91	15	82	6
Indeno[1,2,3-cd]perileno	86	19	85	8
Dibenzo[a,h]antraceno	86	19	85	7
Benzo[g,h,i]perileno	79	20	82	8

#### 4.4 Avaliação da granulometria e do teor de matéria orgânica (MO)

A caracterização granulométrica do sedimento é importante devido à facilidade dos compostos orgânicos se encontrarem preferencialmente adsorvidos em determinadas espécies minerais [75]. Para a classificação dos sedimentos, normalmente utiliza-se a escala granulométrica de Wentworth [76], apresentada na Tabela 15.

**Tabela 15** - Escala granulométrica de Wentworth. **Fonte:** Barbosa, 2014 [76].

Classificação	Diâmetro	
	Phi ( $\Phi$ )	(mm)
Areia muito grossa	-1 a 0	2 a 1
Areia grossa	0 a 1	1 a 0,5
Areia média	1 a 2	0,5 a 0,25
Areia fina	2 a 3	0,25 a 0,125
Areia muito fina	3 a 4	0,125 a 0,062
Silte	4 a 8	0,062 a 0,00394
Argila	8 a 12	0,00394 a 0,0002

Phi ( $\Phi$ ) corresponde à unidade de medida do diâmetro da partícula do sedimento, cuja equivalência em milímetros é apresentada na terceira coluna.

A fração contendo argila e o silte, por possuir uma área superficial maior adsorve uma quantidade maior de matéria orgânica. Já a areia pode ser considerada inerte ou que adsorve quantidades insignificantes de matéria orgânica [75,76]. Como os HPA são compostos lipofílicos agregam-se mais facilmente na fração fina.

As amostras dos sedimentos de mangue coletadas tem aspecto lamoso, o que normalmente está associado à baixa granulometria (< 0,062 mm) [76]. Isso pode ser confirmado pelo alto teor de lama (silte + argila) encontrado, onde os valores médios encontrados estão acima de 57% (Tabela 16). Este alto teor de lama é característico do ambiente de manguezal, onde há a predominância de sedimentos finos.

O teor de matéria orgânica (MO) variou entre 9,1 e 20,8 % (Tabela 16), sendo que sedimentos são considerados ricos em MO quando apresentam valores acima de 0,5 % [75]. O ponto com menor teor de MO foi o do rio Poxim, que apresenta também o maior teor de areia e como consequência uma menor interação com a matéria orgânica. O inverso também foi observado, onde o ponto com maior teor de MO foi aquele com maior teor de lama. Os dados obtidos de MO corroboram com a granulometria, visto que as amostras com maior teor de MO são aquelas que são formadas em maior quantidade por

partículas mais finas, que são mais susceptíveis ao acúmulo de matéria orgânica em relação à granulometria maior.

**Tabela 16** - Teor de lama e matéria orgânica encontrada nos sedimentos de mangue coletados.

Pontos	Localização	Teor de lama (silte + argila)	Teor de matéria orgânica %
P1	Rio Gameleiro (Abaís, Estância, SE)	61,7%	9,1
P2	Rio Vaza-Baris (Orla Pôr-do-sol, Aracaju, SE)	94,8%	20,8
P3	Rio Poxim (Aracaju, SE)	57,1%	4,5
P4	Rio Sergipe (Jatobá, Barra dos Coqueiros, SE)	83,2%	8,7

#### 4.5 Determinação quantitativa de HPA em sedimentos de mangue e caranguejo-uçá

##### 4.5.1 Determinação quantitativa de HPA em sedimento de mangue

Quatro amostras de sedimento de mangue de diferentes regiões do Estado de Sergipe foram coletadas e analisadas em duplicata. A quantificação foi feita com o auxílio das curvas analíticas preparadas no solvente (hexano), com coeficientes de correlação acima de 0,99.

Os resultados obtidos mostraram uma expressiva quantidade de HPA nos sedimentos (Tabela 17). O ponto P3 foi o que apresentou maiores quantidades de HPA, sendo este ponto localizado em área urbana, próximo a local de

despejo de resíduos, enquanto que os demais pontos são mais distantes de locais urbanizados. Este ponto apresenta um nível moderado de contaminação segundo Baumard *et al.*, 1998 [77], pois apresenta valores de  $\Sigma\text{HPA} > 100\text{-}1100 \text{ ng g}^{-1}$ . Os demais pontos são classificados como nível baixo de poluição, apresentando valores de  $\Sigma\text{HPA} < 100 \text{ ng g}^{-1}$ .

**Tabela 17** - Concentração média (n=2) em  $\text{ng g}^{-1}$  encontrada dos HPA nas amostras de sedimento de mangue

HPA	P1	P2	P3	P4
Naftaleno	1,3	1,5	0,7	0,7
Acenaftileno	n.d	<LQ	5,0	<LQ
Acenafteno	n.d	3,9	<LQ	<LQ
Fluoreno	<LQ	0,9	3,2	<LQ
Fenantreno	<LQ	<LQ	42,1	<LQ
Antraceno	n.d	<LQ	<LQ	<LQ
Fluoranteno	1,4	3,2	149,8	13,3
Pireno	1,3	3,3	77,0	11,3
Benzo[a]antraceno	n.d	n.d	53,1	7,7
Criseno	8,5	16,7	49,9	6,6
Benzo[b]fluoranteno	<LQ	<LQ	128,1	9,4
Benzo[k]fluoranteno	<LQ	<LQ	43,9	<LQ
Benzo[a]pireno	<LQ	<LQ	95,5	<LQ
Indeno[1,2,3-cd]perileno	n.d	n.d	77,5	<LQ
Dibenzo[a,h]antraceno	<LQ	n.d	18,3	<LQ
Benzo[g,h,i]perileno	n.d	n.d	69,4	<LQ
$\Sigma\text{HPA}$	12,5	29,5	813,3	49,0

n.d- não detectado; <LQ- abaixo do limite de quantificação

O órgão internacional regulamentador *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA) [78], dos Estados Unidos, estabelece valores limite de

HPA em sedimentos marinhos, que servem de parâmetro para avaliar os efeitos relativos à exposição humana aos HPA (Tabela 18). Para os pontos P1, P2 e P4 os valores encontram-se abaixo do valor limite onde não há risco em potencial, diferente do ponto P3 que apresentou valores bem acima do recomendado para a maioria dos HPA.

**Tabela 18** - Concentração média ( $\text{ng g}^{-1}$ ) encontrada dos HPA nas amostras de sedimento de mangue em comparação com os valores estabelecidos pela NOAA.

HPA	NOAA		P1	P2	P3	P4
	TEL <sup>a</sup>	PEL <sup>b</sup>				
Naftaleno	14,6	600,0	1,3	1,5	0,7	0,7
Acenaftileno	-	-	n.d	<LQ	5,0	<LQ
Acenafteno	-	-	n.d	3,9	<LQ	<LQ
Fluoreno	10,0	-	<LQ	0,9	3,2	<LQ
Fenantreno	18,7	515	<LQ	<LQ	42,1	<LQ
Antraceno	10,0	-	n.d	<LQ	<LQ	<LQ
Fluoranteno	31,4	2355	1,4	3,2	149,8	13,3
Pireno	44,2	875	1,3	3,3	77,0	11,3
Benzo[a]antraceno	15,7	385	n.d	n.d	53,1	7,7
Criseno	26,8	862	8,5	16,7	49,9	6,6
Benzo[b]fluoranteno	-	-	<LQ	<LQ	128,1	9,4
Benzo[k]fluoranteno	27,2	-	<LQ	<LQ	43,9	<LQ
Benzo[a]pireno	32,4	782	<LQ	<LQ	95,5	<LQ
Indeno[1,2,3-cd]perileno	17,3	-	n.d	n.d	77,5	<LQ
Dibenzo[a,h]antraceno	10,0	-	<LQ	n.d	18,3	<LQ
Benzo[g,h,i]perileno	-	-	n.d	n.d	69,4	<LQ
$\Sigma$ HPA	264,1	-	12,5	29,5	813,3	49,0

<sup>a</sup> TEL (threshold effects level) ( $\text{ng g}^{-1}$ ): limite de concentração abaixo do qual não há risco potencial de efeitos adversos; <sup>b</sup> PEL (probable effects level) ( $\text{ng g}^{-1}$ ): nível acima do qual se espera que efeitos adversos ocorram. Adaptada de Barbosa, 2014 [76].

Os valores encontrados nos sedimentos de mangue de Sergipe podem ser considerados baixos quando comparados com outros reportados na literatura (Tabela 19); contudo, os locais em comparação encontram-se em regiões consideradas com forte atividade industrial, diferentemente dos estudados neste trabalho.

**Tabela 19** - Concentração total de HPA ( $\Sigma$ HPA) encontrada em sedimentos de mangue de diferentes locais.

Locais	Faixas ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Referências
Sergipe, Brasil	12-813	Neste estudo
Ilha de Guadalupe, França	103-1657	[79]
Baía de Guanabara, Brasil	26-2290	[6]
Hong Kong, China	356-6186	[80]

#### 4.5.2 Determinação quantitativa de HPA em hepatopâncreas de caranguejo-uçá

O hepatopâncreas de caranguejo-uçá de quatro diferentes regiões de mangue do Estado de Sergipe foi analisado em duplicata, usando o método de extração por MSPD validado. A quantificação foi feita com o auxílio das curvas analíticas preparadas no extrato da matriz com coeficientes de correlação acima de 0,99.

Os resultados mostraram que para os pontos P1, P2 e P4, a concentração de HPA encontrada pode ser considerada baixa (Tabela 20). Já o ponto P3 apresentou concentrações maiores para os HPA fluoranteno, pireno e benzo[a]antraceno, sendo este último um dos mais tóxicos, classificado como “provavelmente cancerígeno” ao homem pela organização internacional IARC. Isto pode estar relacionado a localização desse ponto, que como já mencionado, fica em área urbana e apresentou nível moderado de contaminação no sedimento, confirmando a capacidade de bioacumulação desse organismo.

**Tabela 20** - Concentração média (n=2) em ng g<sup>-1</sup> encontrada dos HPA nas amostras de hepatopâncreas de caranguejo-uçá.

HPA	P1	P2	P3	P4
Naftaleno	2,7	1,9	1,5	2,1
Acenaftileno	n.d	n.d	<LQ	n.d
Acenafteno	<LQ	n.d	3,2	n.d
Fluoreno	<LQ	1,0	2,4	n.d
Fenantreno	<LQ	<LQ	<LQ	n.d
Antraceno	<LQ	<LQ	<LQ	n.d
Fluoranteno	<LQ	<LQ	6,5	3,1
Pireno	<LQ	<LQ	20,8	<LQ
Benzo[a]antraceno	<LQ	10,3	26,6	n.d
Criseno	<LQ	<LQ	<LQ	n.d
Benzo[b]fluoranteno	<LQ	<LQ	<LQ	n.d
Benzo[k]fluoranteno	<LQ	<LQ	<LQ	n.d
Benzo[a]pireno	<LQ	<LQ	<LQ	n.d
Indeno[1,2,3-cd]perileno	<LQ	n.d	<LQ	n.d
Dibenzo[a,h]antraceno	n.d	<LQ	<LQ	n.d
Benzo[g,h,i]perileno	<LQ	<LQ	<LQ	n.d
ΣHPA	2,7	13,2	54,5	5,2

n.d- não detectado; <LQ- abaixo do limite de quantificação

Ao comparar os valores de ΣHPA encontrados neste trabalho com outros trabalhos que também determinaram HPA em hepatopâncreas de crustáceos [6, 51] conclui-se que a quantidade de HPA nos caranguejos-uçá dos mangues estudados neste trabalho é considerada baixa, indicando assim uma baixa contaminação desses organismos (Tabela 21).



**Tabela 21** - Concentração total de HPA ( $\Sigma$ HPA) encontrada em hepatopâncreas de crustáceos

Locais	$\Sigma$ HPA (ng g <sup>-1</sup> )	Espécies	Referências
P1	2,7	<i>Ucides cordatus</i>	Neste estudo
P2	13,2	<i>Ucides cordatus</i>	Neste estudo
P3	54,5	<i>Ucides cordatus</i>	Neste estudo
P4	5,2	<i>Ucides cordatus</i>	Neste estudo
Baía de Guanabara/RJ (Nova Orleans)	445,0	<i>Ucides cordatus</i>	[6]
Baía de Guanabara/RJ (Suruí)	2290,0	<i>Ucides cordatus</i>	[6]
Baía de Guanabara/RJ (Peteca)	386,0	<i>Ucides cordatus</i>	[6]
Conception Bay (Canadá)	1120,0	<i>Chionocetes opilio</i>	[51]
Conception Bay (Canadá)	180,0	<i>Hyas coarctatus</i>	[51]

## 5. CONCLUSÕES

O método de extração por dispersão da matriz em fase sólida, empregando 0,5 g de amostra, 1,5 g de florisil como dispersante, 0,5 g de sulfato de sódio como agente secante, 0,5 g de C<sub>18</sub> como adsorvente auxiliar e 10 mL de acetonitrila como solvente de eluição, mostrou-se eficiente na extração dos HPA, com exceção do naftaleno. Os valores de recuperação ficaram na faixa de 63-115% e coeficientes de variação entre 4-19%, ambos dentro do intervalo recomendado.

A validação do método foi feita com base nos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez, os quais mostraram que o método proposto utilizando as técnicas de MSPD e GC/MS foi eficiente para determinação de HPA prioritários em hepatopâncreas de caranguejo-uçá.

A quantificação de HPA em amostra de hepatopâncreas de caranguejo-uçá coletados em diferentes mangues de Sergipe mostrou uma baixa ou inexistente contaminação nos pontos P1, P2 e P3. O ponto P3 apresentou concentração de benzo[a]antraceno de 26,6 ng g<sup>-1</sup>, sendo este HPA considerado como “provavelmente cancerígeno” pela IARC.

As análises de granulometria e matéria orgânica corroboraram entre si, mostrando que o sedimento de mangue é formado principalmente por partículas finas, o que resulta em uma adsorção maior de matéria orgânica.

A distribuição de HPA nos sedimentos mostrou uma variação significativa entre os pontos de amostragem, sendo o ponto P3 classificado como nível moderado e os demais como nível baixo de contaminação, evidenciando que a presença de atividade antrópica próxima a estes ambientes influenciam diretamente no aporte de HPA.

Os valores de concentração de HPA obtidos para o hepatopâncreas e o seu respectivo sedimento confirmam a capacidade desse organismo bioacumular estes contaminantes, tornando-se necessário um monitoramento frequente a fim de evitar o consumo de caranguejos contaminados.

## 6. REFERÊNCIAS

- [1] Silva, M. A. B.; Bernini, E.; Carmo, T. M. S. Características estruturais de bosques de mangue do estuário do rio São Mateus, ES, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, **2005**, v.19, n. 3, p. 465-471.
- [2] Santos, L. C. M.; Matos, H. R.; Schaeffer-Novelli, Y.; Cunha-Lignon, M.; Bitencourt, M. D.; Koedam, N.; Dahdouh-Guebas, F. Anthropogenic activities on mangrove areas (São Francisco River Estuary, Brazil Northeast): A GIS-based analysis of CBERS and SPOT images to aid in local management. *Ocean & Coastal Management*, **2014**, v. 89, 39-50.
- [3] Ferreira, V. R. Otimização de protocolo analítico para extração e fracionamento de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos em sedimentos. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Paraná, **2010**.
- [4] Li, F.; Zeng, X.; Yang, J.; Zhou, K.; Zan, Q.; Lei, A.; Tam, N. F. Y. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surfasse sediments and plants of mangrove swamps in Shenzhen, China. *Marine Pollution Bulletin*, **2014**, v. 84, 590–596.
- [5] Alves, J. R. P. Manguezais: educar para proteger. Rio de Janeiro: FEMAR: SEMADS, **2001**.
- [6] Nudi, A. H.; Wagener, A. L. R.; Francioni, E.; Scofield, A. L.; Sette, C. B.; Veiga, A. Validation of *Ucides cordatus* as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab PAH records. *Environment International*, **2007**, v. 33, 315–327.
- [7] Simith, D. J. B.; Diele, K. Metamorphosis of mangrove crab megalopae, *Ucides cordatus* (Ocypodidae): Effects of interspecific versus intraspecific

settlement cues. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **2008**, v. 362, 101–107.

[8] Caruso, M. S. F.; Alaburda, J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, **2008**, v. 67, n.1, 1-27.

[9] Bansal, V.; Kim, K.; Review of PAH contamination in food products and their health hazards. *Environment International*, **2015**, v.84, 26–38.

[10] Fidalgo-Used, N.; Blanco-González, E.; Sanz-Medel, A. Sample handling strategies for the determination of persistente trace organic contaminants from biota samples. *Analytica Chimica Acta*, **2007**, v. 590, 1–16.

[11] Kathiresan, K.; Bingham, B. L. Advances in marine biology. *Biology of mangroves and mangrove ecosystems*, **2001**, v. 40, 81-251.

[12] Selvam, V.; Karunagaran, V. M. Ecology and biology of mangroves (Orientation Guide), **2004**.

[13] Giri, C.; Ochieng, E.; Tieszen, L. L; Zhu, Z.; Singh, A.; Loveland, T.; Masek J.; Duke, N. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. *Global Ecology and Biogeography*, **2011**, v. 20, 154–159.

[14] <http://www.adema.se.gov.br/> (acessado em 12 de maio de 2016).

[15] Santos, E. C. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) e saturados em sedimentos superficiais de manguezais da ilha de Itaparica, Bahia, Brasil. Dissertação de mestrado, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, **2012**.

- [16] Ramos, D. G. B.; Filho, J. G. M.; Polivanov, H. Influência da matéria orgânica e argilominerais na migração de compostos derivados de hidrocarbonetos. 2º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo & Gás, **2005**.
- [17] Zhang, J.; Cai, L.; Yuan, D.; Chen, M. Distribution and sources of polynuclear aromatic hydrocarbons in mangrove surficial sediments of Deep Bay, China. *Marine Pollution Bulletin*, v.49, **2004**, 479–486.
- [18] Taniguchi, S. Avaliação da contaminação por hidrocarbonetos e organoclorados em diferentes compartimentos do ambiente marinho do estado do Rio de Janeiro. Tese de doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, **2002**.
- [19] Cossa, D. A review of the use of *Mytilus* spp. as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in coastal Waters. *Oceanologica Acta*, **1989**, v. 12, n. 4, 417-432.
- [20] Mendonça, J. T.; Pereira, A. L. C. Avaliação das capturas de caranguejo-uçá *ucides cordatus* no município de Iguape, litoral sul de São Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, **2009**, v. 35, n. 2, 169 – 179.
- [21] Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Secretaria de Monitoramento e Controle do Ministério da Pesca e Aquicultura, **2011**.
- [22] Corrêa, C. T. I.; Gesteira, T. C. V. Sinopse das observações sobre a Bioecologia e pesca do caranguejo-uçá, *ucides cordatus cordatus* (linnaeus, 1763), capturado em estuários de sua área de ocorrência no Brasil, **1999**.
- [23] Pinheiro, M. A. A.; Silva, P. P. G.; Duarte, L. F. A.; Almeida, A. A.; Zanotto, F. P. Accumulation of six metals in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae) and its food source, the red mangrove *Rhizophora mangle* (Angiosperma: Rhizophoraceae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2012**, v. 81, 114–121.

- [24] Caldas, S.S.; Bolzan, C.M.; Menezes, E.J.; Escarrone, A. L. V.; Martins, C. M. G.; Bianchini, A.; Primel, E.G. A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fish liver and crab hepatopancreas with determination by GC–MS. *Talanta*, v. 112, **2013**, 63–68.
- [25] Sette, C. B.; Pedrete, T. A.; Felizzola, J.; Nudi, A. H.; Scofield, A. L. Formation and identification of PAHs metabolites in marine organism. *Marine Environmental Research*, **2013**, v. 91, 2-13.
- [26] Nudi, A. H.; Wagener, A. L. R.; Francioni, E.; Sette, C. B.; Sartori, A. V.; Scofield, A. L. Biomarkers of PAHs exposure in crabs *Ucides cordatus*: Laboratory assay and field study. *Environmental Research*, **2010**, v. 110, 137-145.
- [27] Marcolin, C. R.; Carqueija, C. R. G.; Tozetto, S. O.; Oliveira, D. C.; Côrrea, A. M. A. Alterações morfológicas do hepatopâncreas de *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) em relação aos estádios de intermuda e pré-muda inicial. *Revista Brasileira de Zoociências*, **2008**, v. 10, n. 2, 97-104.
- [28] Lopes, W. A.; Andrade, J. B. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. *Química Nova*, **1996**, v. 19, n. 5, 497-516.
- [29] Brunete, C. S.; Miguel, E.; Tadeo, J. L. Analysis of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry in sewage sludge from the Spanish area of Madrid. *Journal of Chromatography A*, **2007**, v. 1148, 219–227.
- [30] Sisinnio, C. L. S.; Oliveira-Filho, E. C.; *Princípios de toxicologia ambiental: conceitos e aplicações*. Editora Interciência: Rio de Janeiro, 2013.
- [31] Netto, A. D.; Dias, A. E. X. O.; Moreira, J. C.; Arbilla, G.; Ferreira, L. F. V.; Oliveira, A. S.; Barek, J. Avaliação da contaminação humana por

hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): Uma revisão metodológica. *Química Nova*, **2000**, v. 23, n. 6, 765-773.

[32] Meniconi, M. F. G. Alguns processos de preparo de alimentos tais como defumação e fritura com óleo de cozinha e queima de incensos também contribuem como fonte pirolítica de HPAs. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, **2007**.

[33] Cotta, J. A. O.; Rezende, M. O. O.; Landgarf, M. D. Avaliação de solventes de extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados. *Química Nova*, **2009**, v. 32, n. 8, 2026-2033.

[34] Ravindra, K.; Sokhi, R.; Grieken, R. V. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment*, **2008**, v. 42, 2895–2921.

[35] CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente); Resolução nº 357, de 17 de março de 2005.  
<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>  
Acessado em 27 de agosto de 2015.

[36] Purcaro, G.; Moret, S.; Conte, L.S. Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: Occurrence, legislation and innovative determination in foods. *Talanta*, **2013**, v. 105, 292–305.

[37] Meire, R. O.; Azeredo, A.; Torres, J. P. M. Aspectos toxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, *Oecologia Australis*, v. 11, n. 2, **2007**, 188-201.

[38] Capriotti, A. L.; Cavaliere, C.; Foglia, P.; Samperi, R.; Stampachiachiere, S.; Ventura, S.; Lagana, A. Recent advances and developments in matrix solid-

phase dispersion. *Trends in Analytical Chemistry*, doi: 10.1016/j.trac.2015.03.012, **2015**.

[39] Lanças, F. M. Avanços recentes e tendências futuras das técnicas de separação: uma visão pessoal. *Scientia Chromatographica*, **2008**.

[40] Caldas, S. S.; Rombaldi, C.; Cerqueira, M. B. R.; Soares, B. M.; Primel, E. G. Avanços recentes da MSPD para extração de resíduos de agrotóxicos, PPCPs, compostos inorgânicos e organometálicos. *Scientia Chromatographica*, **2013**, v. 5, n. 3, 190-213.

[41] Dórea, H. S. Dispersão da matriz em fase sólida. In: Figueiredo, E. C.; Borges, K. B.; Queiroz, M. E. C. *Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos*, 1ª ed., Rio de Janeiro: Editora LTC, 2015, 80-87.

[42] Barker, S. A. Matrix solid phase dispersion. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **2007**, v. 70, 151-162.

[43] Navickiene, S.; Aquino, A.; Bezerra, D. S. S.; A matrix solid-phase dispersion method for the extraction of seven pesticides from mango and papaya. *Journal of Chromatographic Science*, **2010**, v. 48, 750-754.

[44] Souza, M. R. R.; Moreira, C. O.; Lima, T. G.; Aquino, A.; Dórea, H. S. Validation of a matrix solid phase dispersion (MSPD) technique for determination of pesticides in lyophilized eggs of the chicken *Gallus gallus domesticus*. *Microchemical Journal*, **2013**, v. 110, 395–401.

[45] Aquino, A., Navickiene, S. MSPD procedure for determination of carbofuran, pyrimethanil and tetraconazole residues in banana by GC–MS. *Chromatographia*, **2009**, v. 70, 1265-1269.

[46] Dawidowicz, L. A.; Wianowska, D. PLE in the analysis of plant compounds Part I. The application of PLE for HPLC analysis of caffeine in green tea leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2005**, v. 37, 1155–1159.



- [47] Fernandes, J. O.; Soares, C. Application of matrix solid-phase dispersion in the determination of acrylamide in potato chips. *Journal of Chromatography A*, **2007**, v. 1175, 1–6.
- [48] Ziarrusta, H.; Olivares, M.; Delgado, A.; Ureta, O. P.; Zuloaga, O.; Etxebarria, N. Multiscreening determination of organic pollutants in molluscs using matrix solid phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, **2015**, 1391, 18–30.
- [49] Sassine, A.; Moura, S.; Léo, V. M.; Bustillos, O. V. Cypermethrin residues determination in the milk of a lactating dairy cow by gas chromatography-ion trap mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, **2004**, v.28, 238-241.
- [50] Albero, B.; Sánchez-Brunete, C.; Tadeo, J. L. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, **2003**, v. 86, n. 3, 576-582.
- [51] Hellou, J.; Upshall, C.; Taylor, D.; O'keefe, R.; O'malley, V.; Abrajanot, T. Unsaturated hydrocarbons in muscle and hepatopancreas of two crab species, chionoecetes opilio and hyas coarctatus. *Marine Pollution Bulletin*, **1994**, v. 28, n. 8, 482-488.
- [52] Kayal, S.; Connellb, D. W. Polycyclic aromatic hydrocarbons in biota from the brisbane river estuary, Australia. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **1995**, v. 40, 475–493.
- [53] Eickhoff, C. V.; HE, S. X.; GOBAS, F. A. P. C.; LAW, F. C. P. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in dungeness crabs (cancer magister) near an aluminum smelter in kitimat arm, British Columbia, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **2003**, v. 22, n. 1, 50–58.

- [54] Fillmann, G.; Watson, G. M.; Howsam, M.; Francioni, E.; Depledge, M. H.; Readman, J. W. Urinary PAH Metabolites as Biomarkers of Exposure in Aquatic Environments. *Environmental Science Technology*, **2004**, v. 38, 2649-2656.
- [55] Pena, M. T.; Casais, M. C.; Mejuto, M. C.; Cela, R. Optimization of the matrix solid-phase dispersion sample preparation procedure for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: Comparison with microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, **2007**, v. 1165, 32–38.
- [56] Concha-Graña, E. C.; Lorenzo, S. M.; Nicola, F.; Aboal, J. R.; Asensio, A. I. R.; Giordano, S.; Reski, R.; Mahía, L. P.; Rodríguez, D. P. Matrix solid phase dispersion method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in moss. *Journal of Chromatography A*, **2015**, v. 1406, 19–26.
- [57] Pensado, L.; Casais, M. C.; Mejuto, M. C.; Cela, R. Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. *Journal of Chromatography A*, **2005**, v. 1077, 103–109.
- [58] Falco, P. C.; Andrés, J. V.; Cabeza, A. S.; Legua, C. M.; Hernandez, R. H. New micromethod combining miniaturized matrix solid-phase dispersion and in-tube in-valve solid-phase microextraction for estimating polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves. *Journal of Chromatography A*, v. 1211, **2008**, 13–21.
- [59] Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, **2004**, v. 27, n. 5, 771-780.
- [60] ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária); Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.
- [61] Leite, F. *Validação em análise química*, 5ª ed.; Editora Átomo: Campinas, 2008.

[62] Santos, A. S. O. Estudo comparativo entre soxhlet e ultra-som para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em sedimentos do estuário do Rio Sergipe por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Dissertação de mestrado, Departamento de Química, Universidade Federal de Sergipe, **2011**.

[63] Kristenson, E. M.; Ramos, L.; Brinkman, U. A. T. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trends in Analytical Chemistry*, **2006**, v. 25, n. 2, 96-111.

[64] Falco, P. C.; Andres, J. V.; Cabeza, A. S.; Legua, C. M.; Hernandez, R. H. New micromethod combining miniaturized matrix solid-phase dispersion and in-tube in-valve solid-phase microextraction for estimating polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves. *Journal of Chromatography A*, **2008**, v. 121, 13–21.

[65] Llasera, M. P. G.; Espejel, J. J. O. Methodology for quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in protozoa cultures. *Journal of the Mexican Chemical Society*, **2011**, v. 55, n. 2, 113-119.

[66] Ferreira, V. R.; Gouveia, C. D.; Silva, C. A.; Fernandes, A. N.; Grassi, M. T. Optimization of an analytical protocol for the extraction, fractionation and determination of aromatic and aliphatic hydrocarbons in sediments. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2012, v. 23, n. 8, 1460-1468.

[67] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGCRE-008, 2003.

[68] Chasin, A. A. M.; Nascimento, E. S.; Ribeiro-Neto, L. M.; Siqueira, M. E. P. B.; Andraus, M. H.; Salvadori, M. C.; Fernícola, N. A. G.; Gorni, R.; Salcedo, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. *Revista Brasileira de Toxicologia*, **1998**, v. 11, 1-6.

[69] Lanças, F. M. Validação de métodos cromatográficos de análise. Editora RiMa: São Carlos, 2004.

[70] Brito, N. M.; Junior, O. P. A.; Polese, L.; Ribeiro, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégias e discussão. *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, **2003**, v. 13, 129-146.

[71] Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. *Química Nova*, **2009**, v. 32, n. 4, 987-995.

[72] Pinho, G. P.; Silvério, F. O.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Starling, M. A. V. M. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. *Química Nova*, **2010**, v. 33, n. 4, 909-913.

[73] Pena, M. T.; Casais, M. C.; Mejuto, M. C.; Cela, R. Development of a matrix solid-phase dispersion method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge samples. *Analytical Chimical Acta*, **2008**, v. 626, 155-165.

[74] Comissão Regulamentadora da União Europeia, Regulamento nº 208/2005, 4 de fevereiro de 2005.

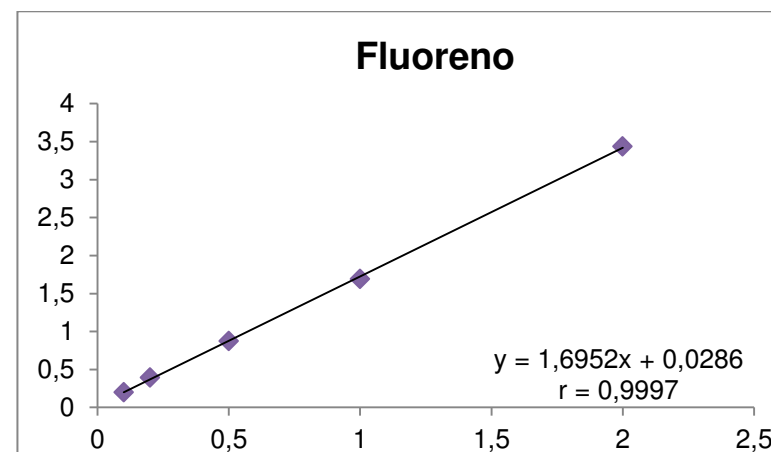
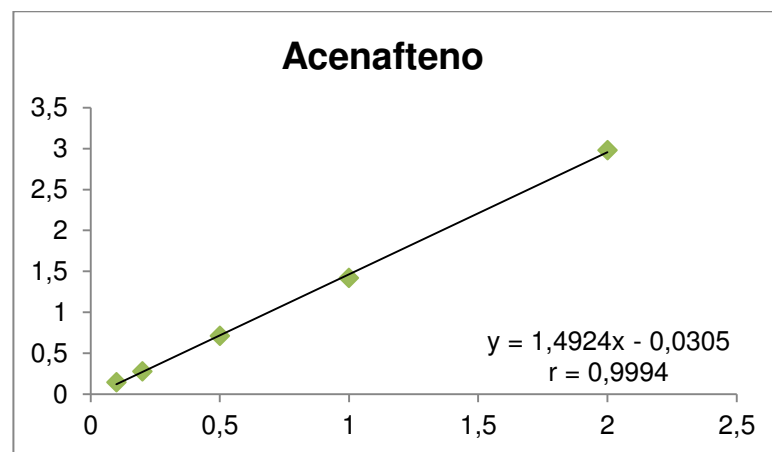
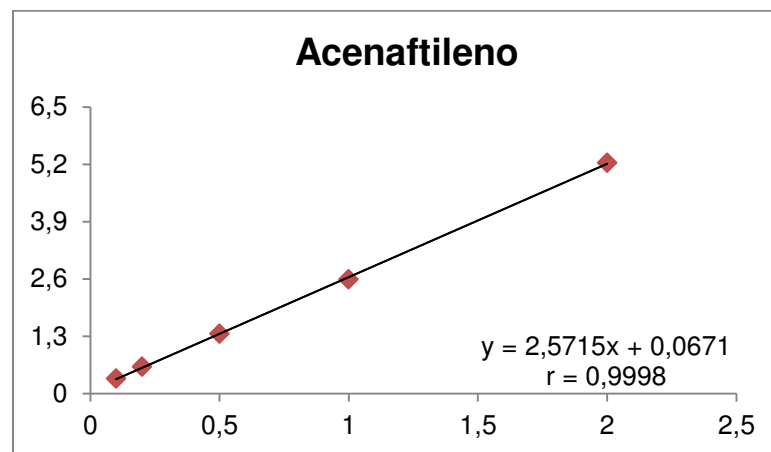
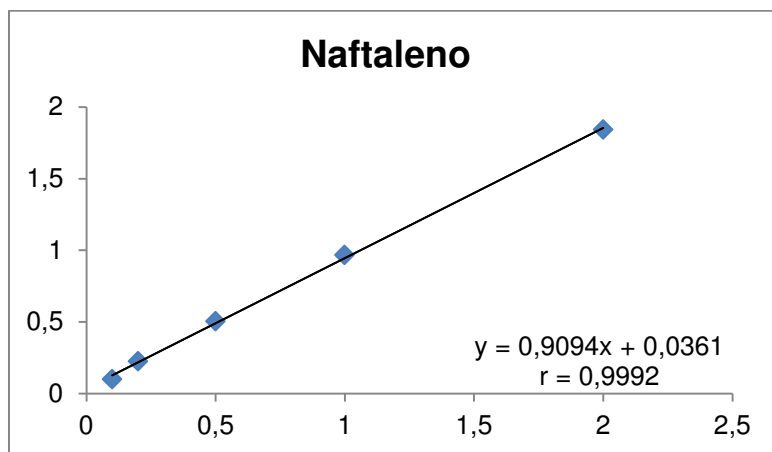
[75] Alexandre, M. R.; Huang, Y.; Madureira, L. A. S. Avaliação de compostos orgânicos em sedimentos superficiais da Baía de Babitonga, Santa Catarina, Brasil. *Geochimica Brasiliensis*, v. 20, **2006**, 208-218.

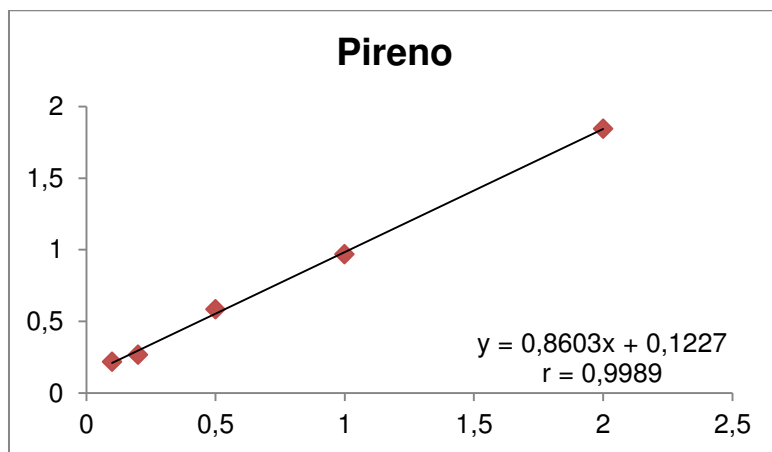
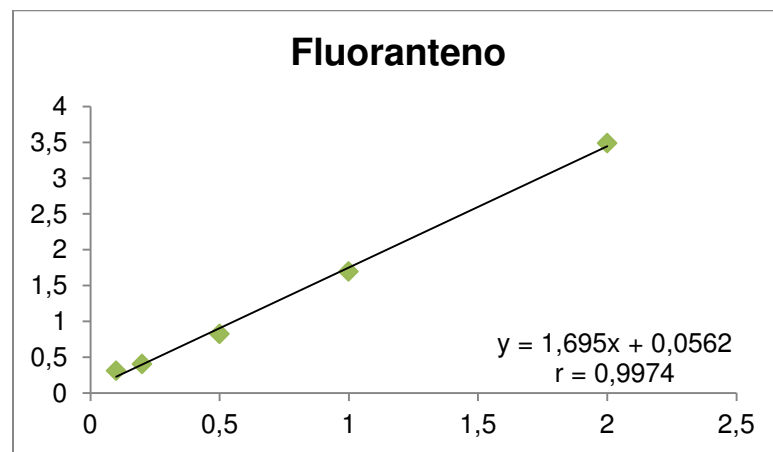
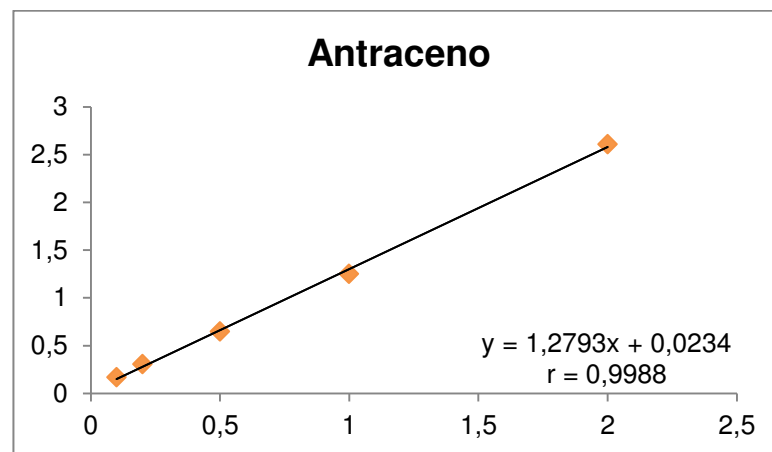
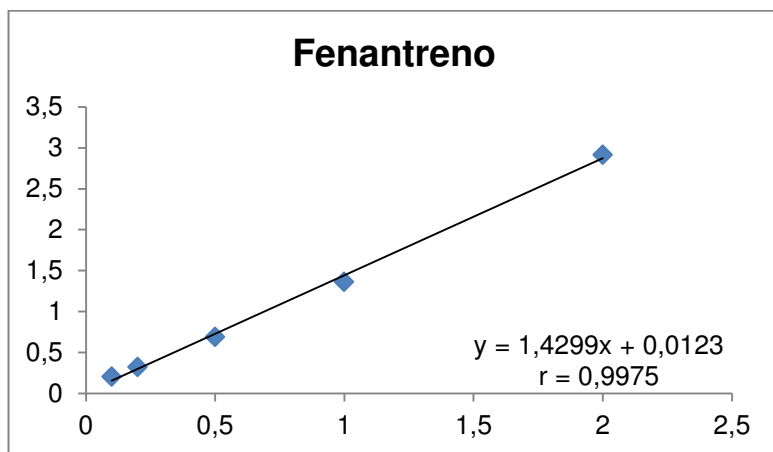
[76] Barbosa, J. C. S. Distribuição espaço-temporal de hidrocarbonetos de petróleo no estuário de rio Vaza-Barris–SE. Dissertação de mestrado, Departamento de Química, Universidade Federal de Sergipe, **2014**.

- [77] Baumard, P.; Budzinski, H.; Garrigues, P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the Western Mediterranean Sea. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 76, **2013**, 298-306.
- [78] NOAA (National Oceanic and Antrophic Administration)  
<http://response.restoration.noaa.gov/>.
- [79] Bernad, D.; Pascaline, H.;Jeremie, J. J. Distribution and origins of hydrocarbons in sediments from lagoons with fringing mangrove communities. *Marine Pollution Bulletin*, v. 32, **1996**, 734-739.
- [80] Tam, , N. F. Y.; Ke, L.; Wang, X. H.; Wong, Y. S. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of mangrove swamps. *Environmental Pollution*, v. 114, **2001**, 255-263.

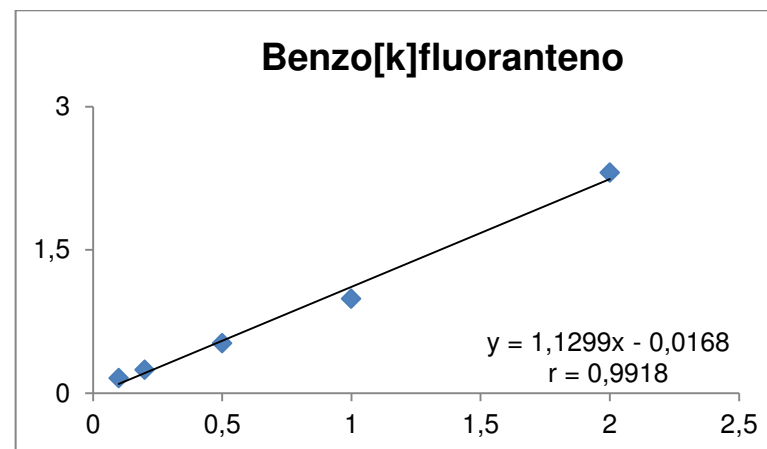
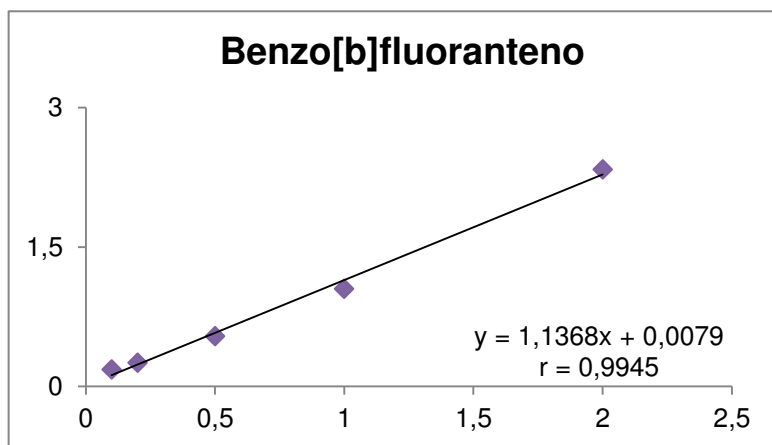
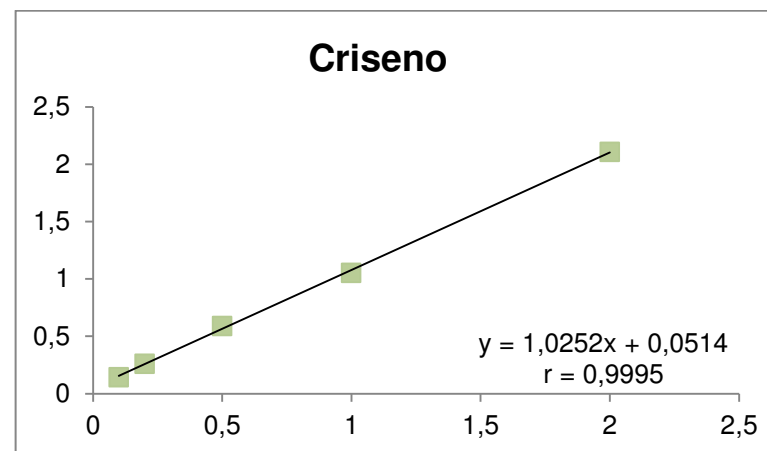
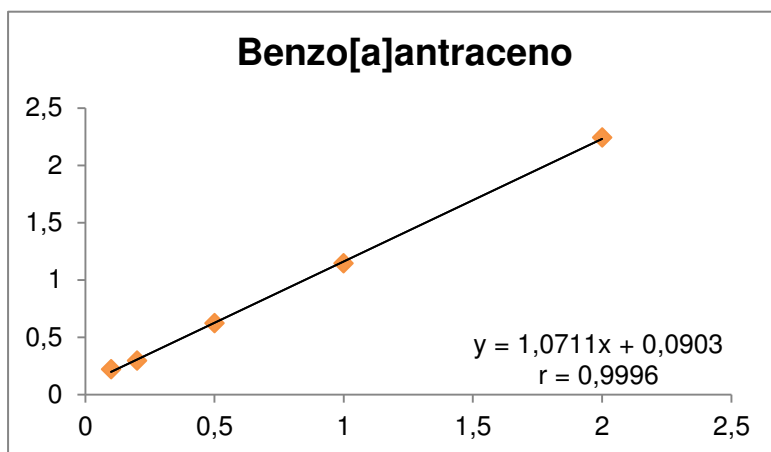
# APÊNDICE

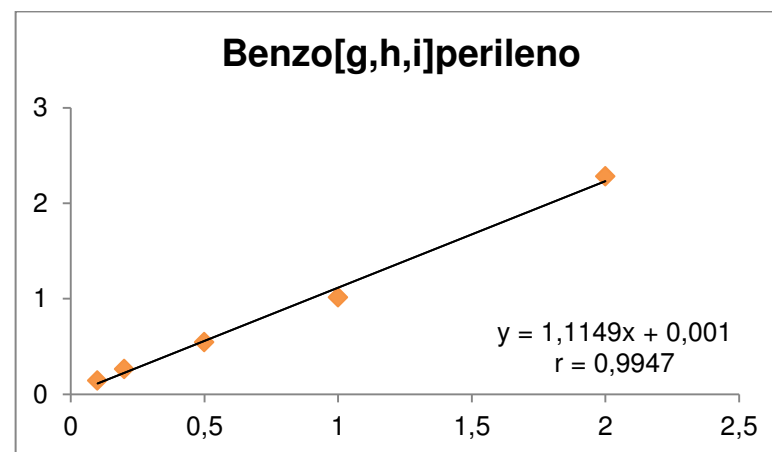
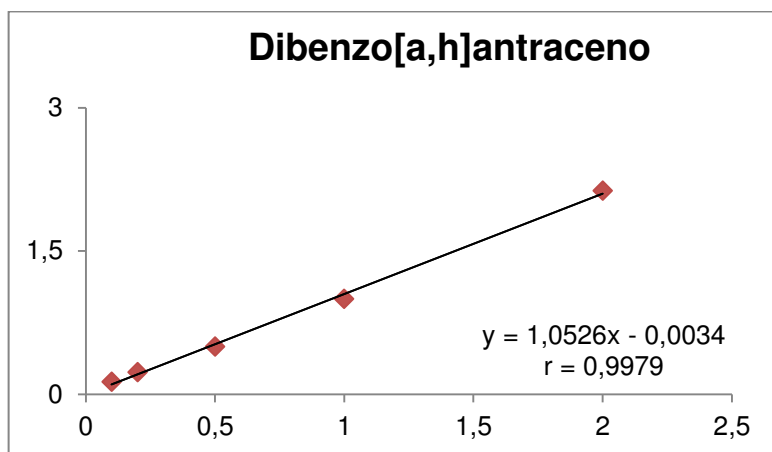
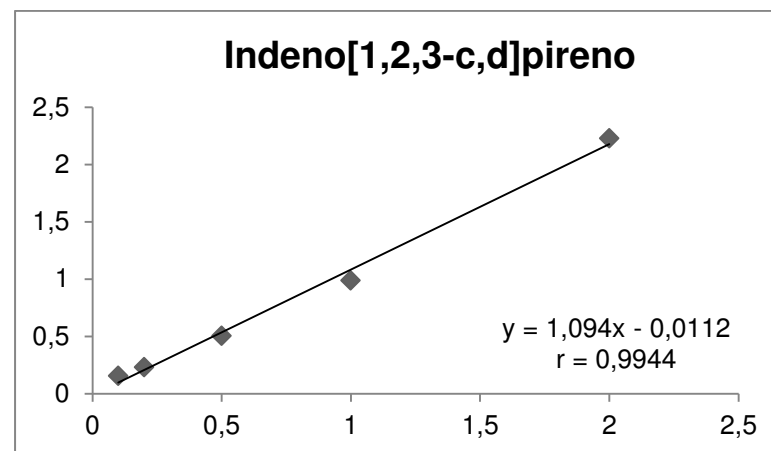
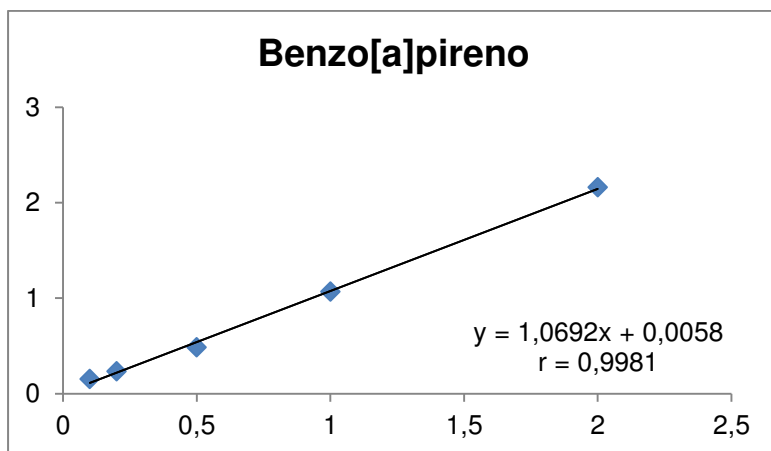
**Apêndice A:** Curvas analíticas dos 16 HPA no extrato da matriz e seus coeficientes de correlação (r).



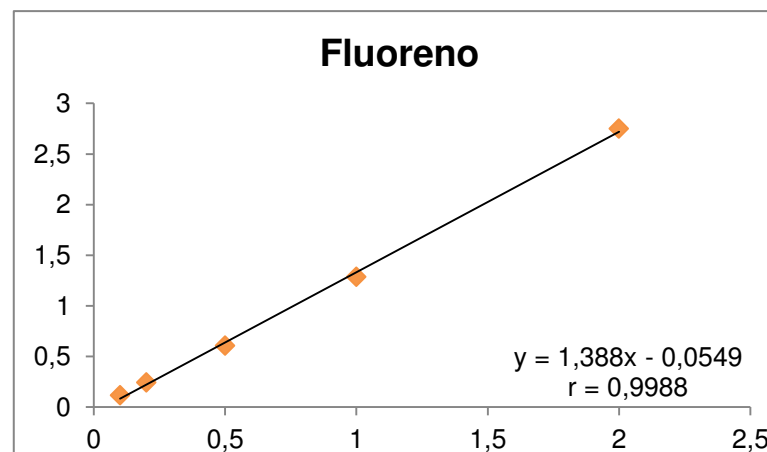
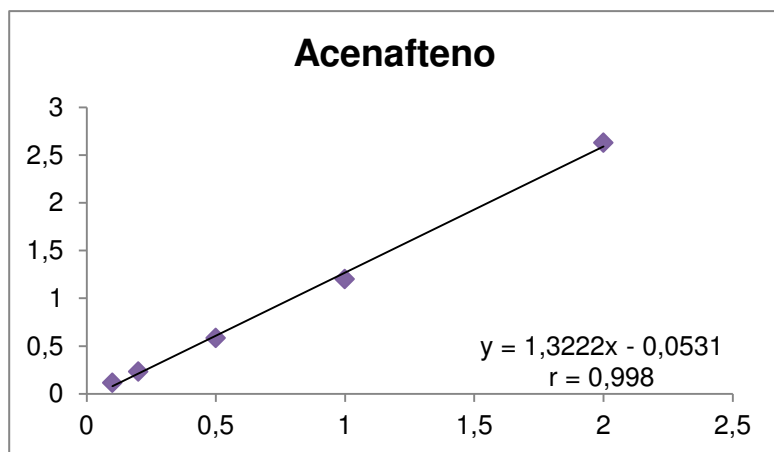
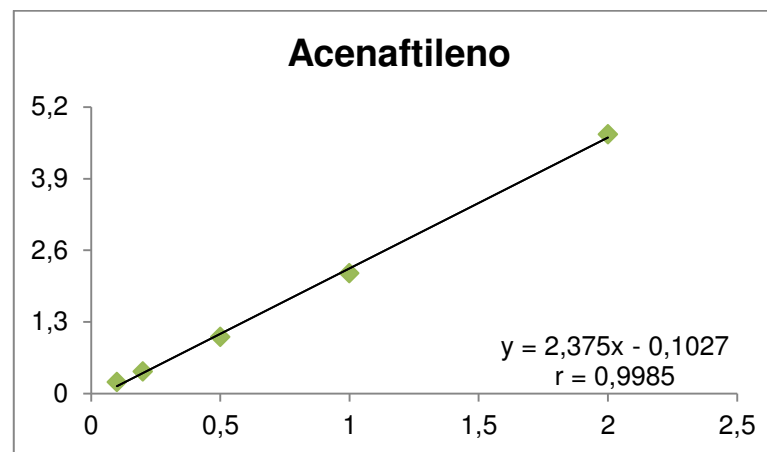
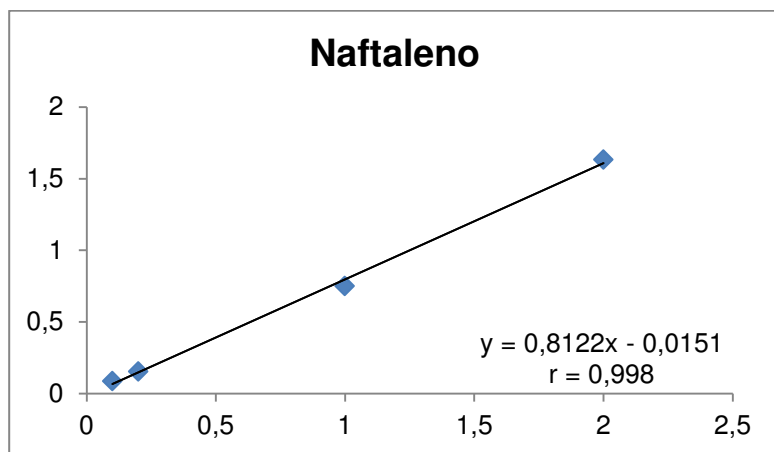


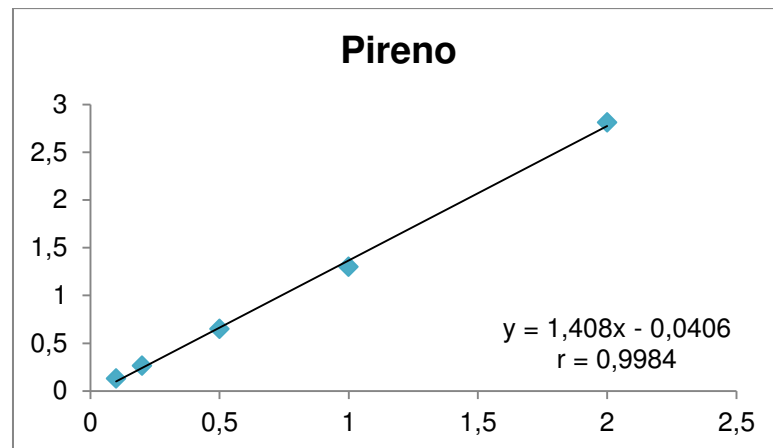
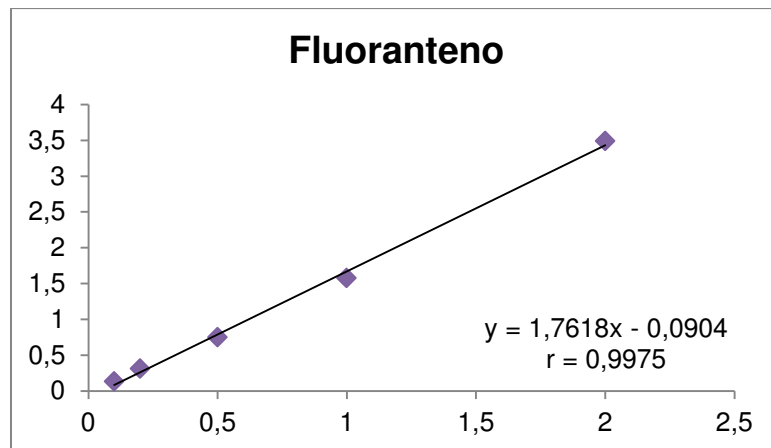
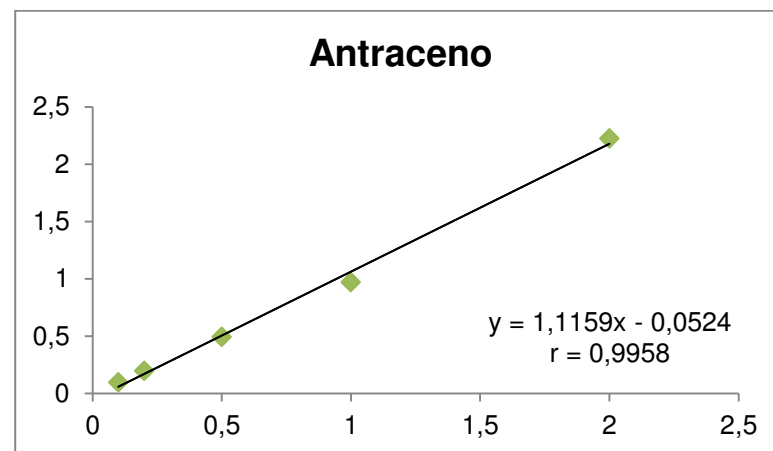
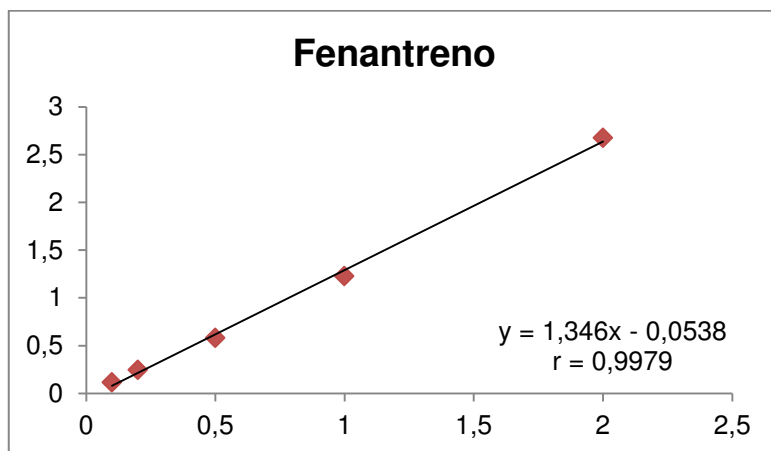


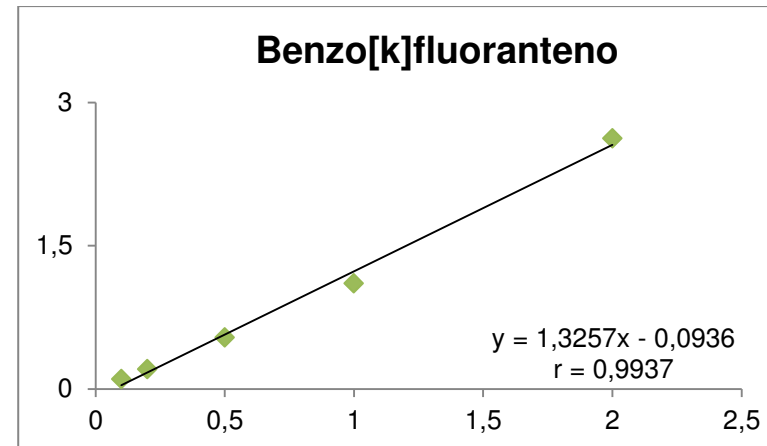
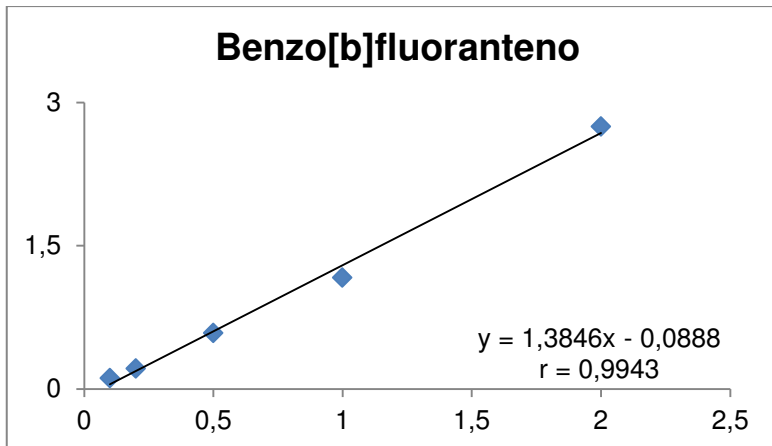
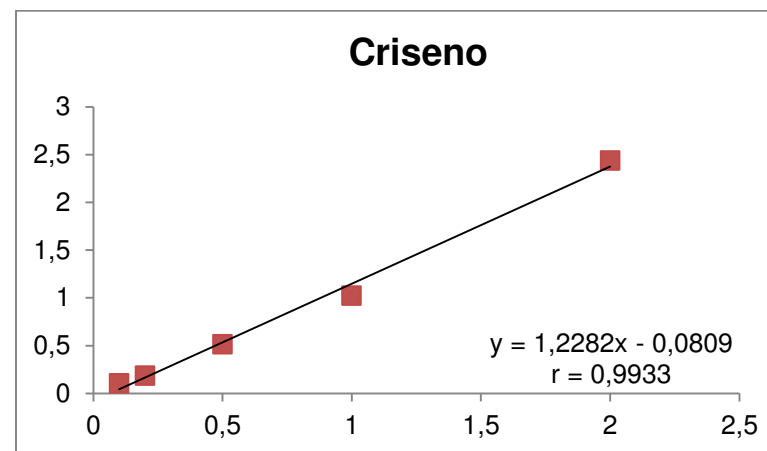
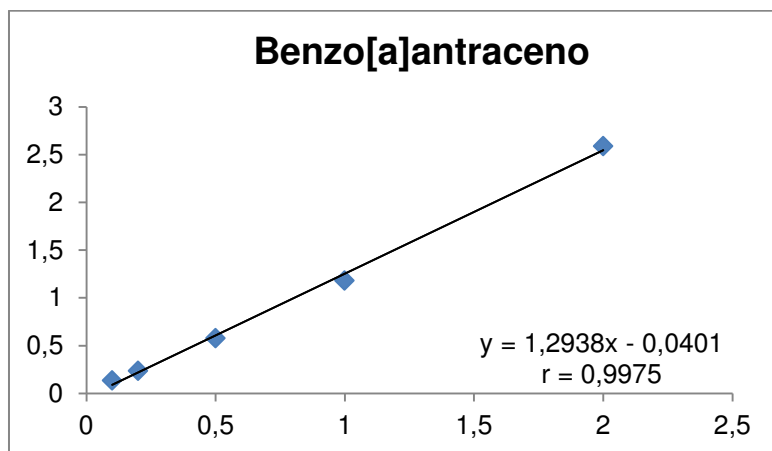


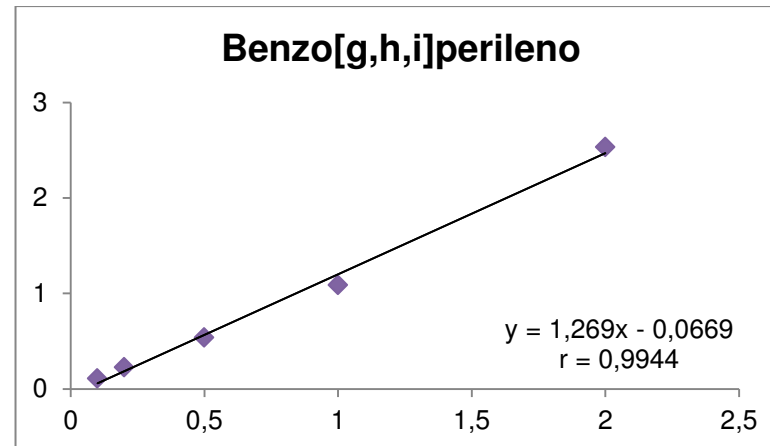
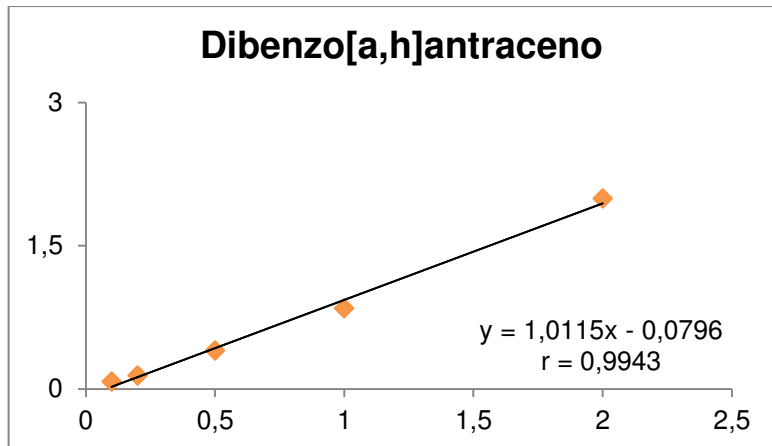
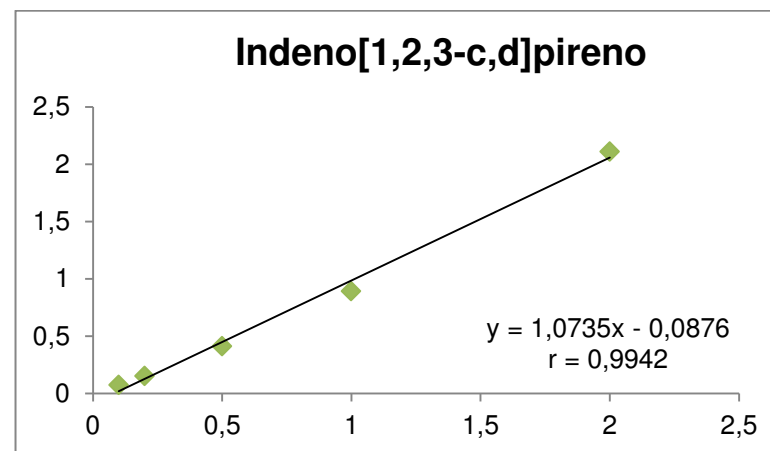
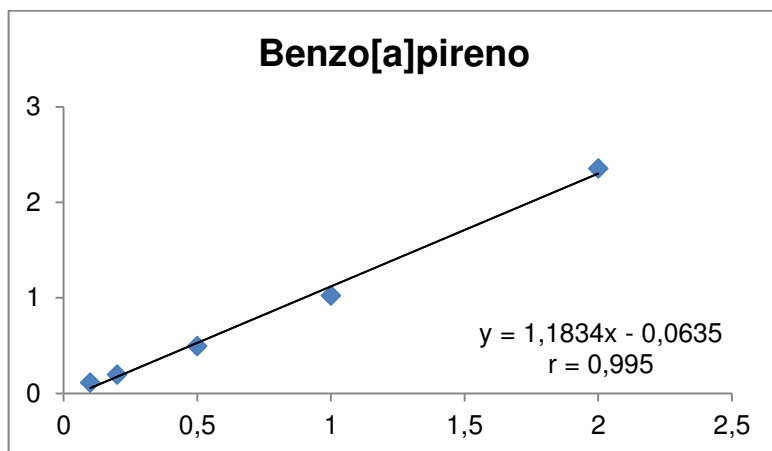


**Apêndice B:** Curvas analíticas dos 16 HPA no solvente e seus coeficientes de correlação (r).



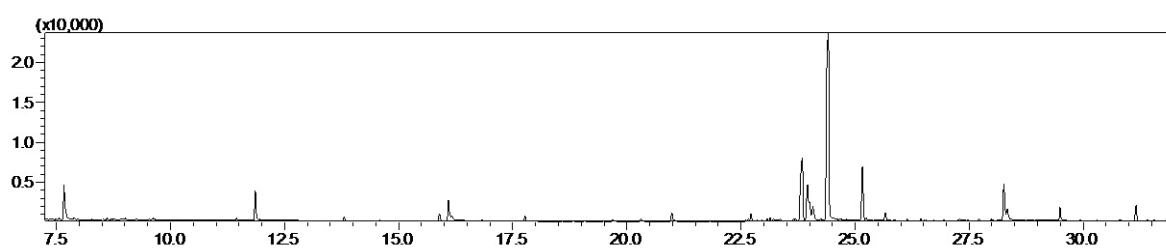
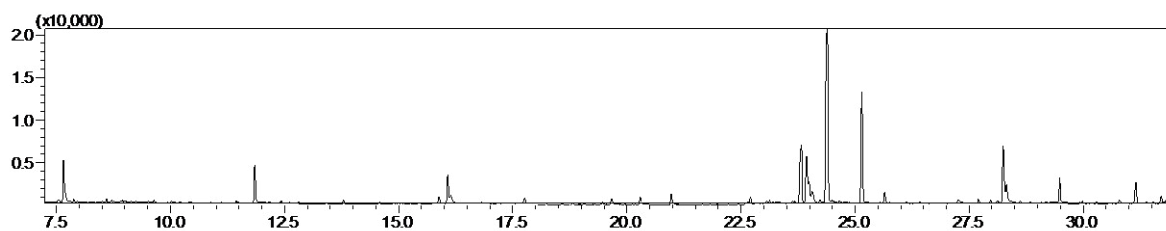




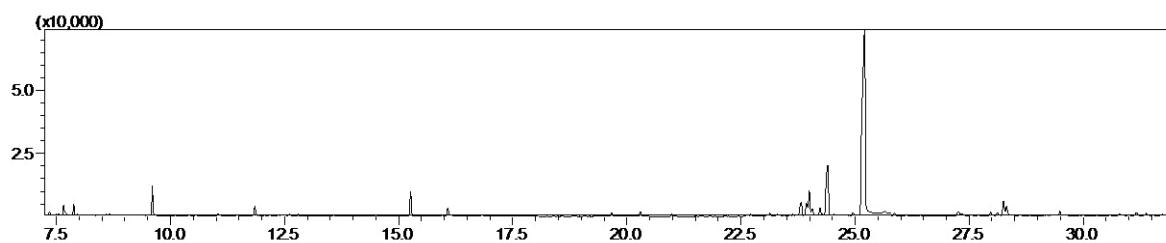
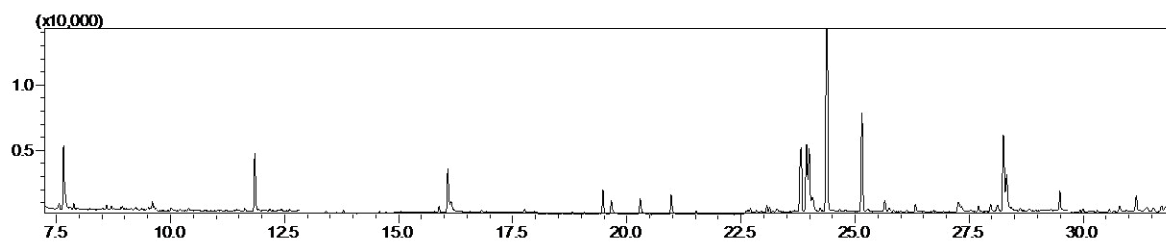


**Apêndice C:** Cromatogramas das amostras de sedimento dos mangues de Sergipe.

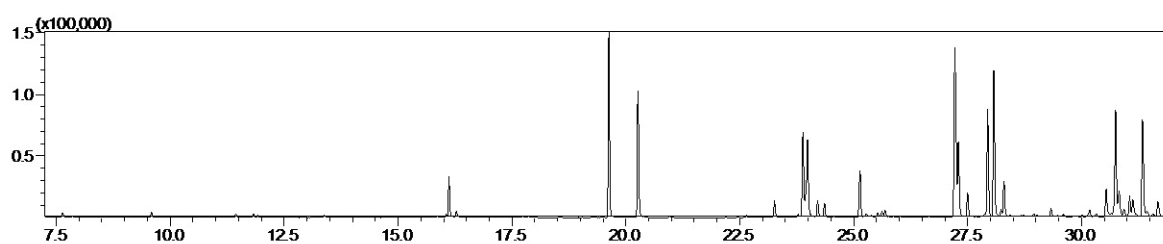
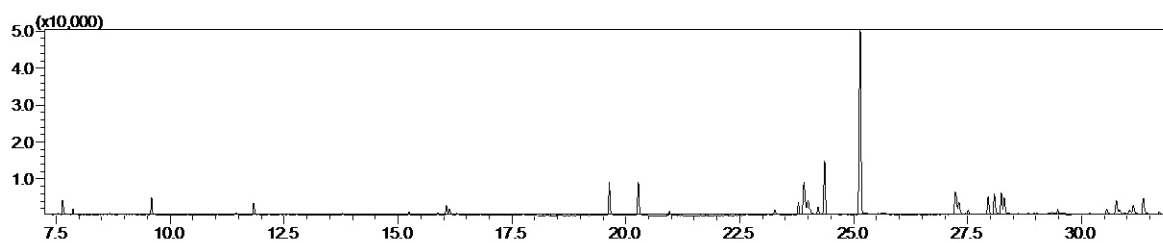
- Gameleiro



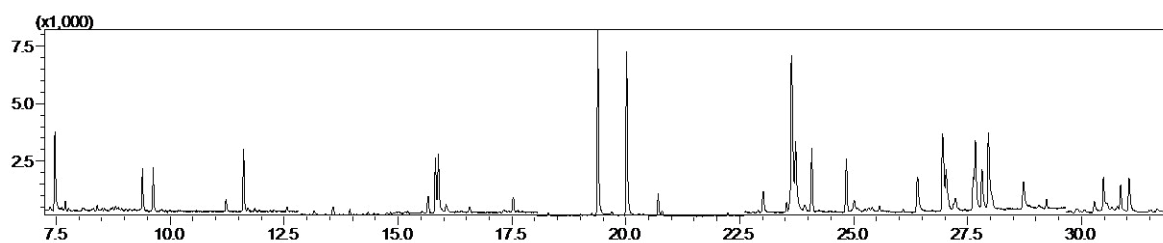
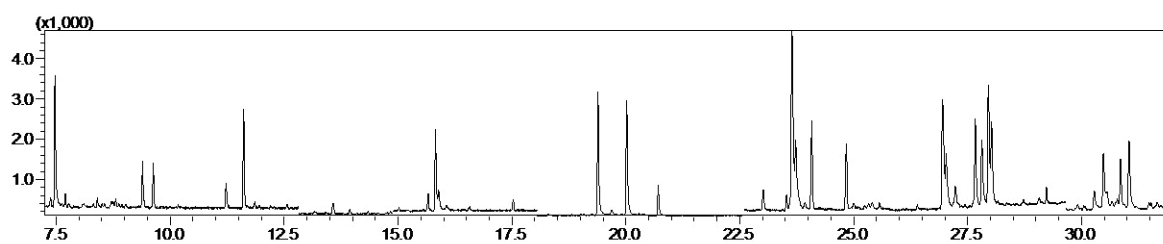
- Vaza-Barris



- Poxim



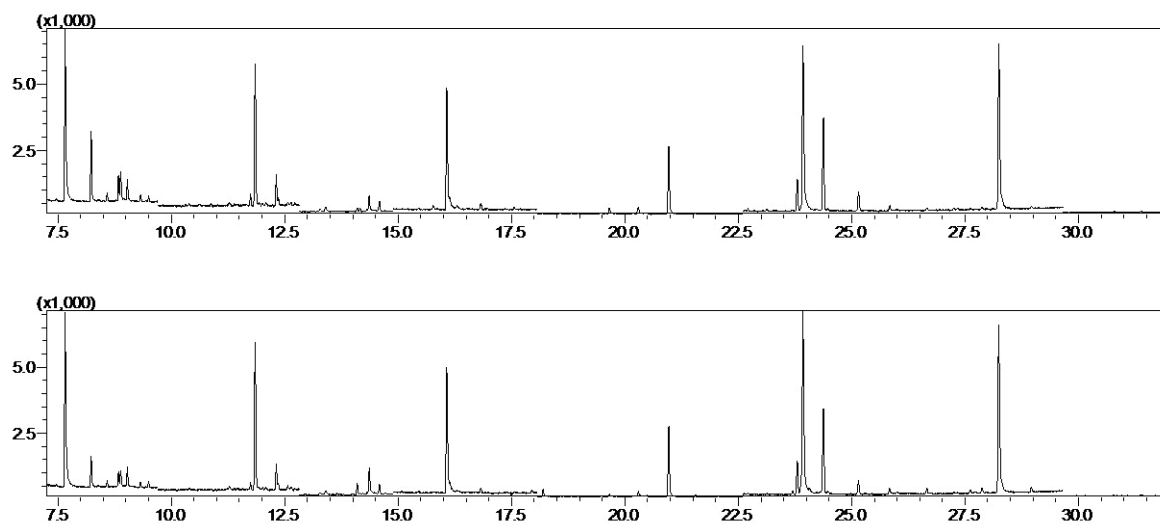
- Sergipe



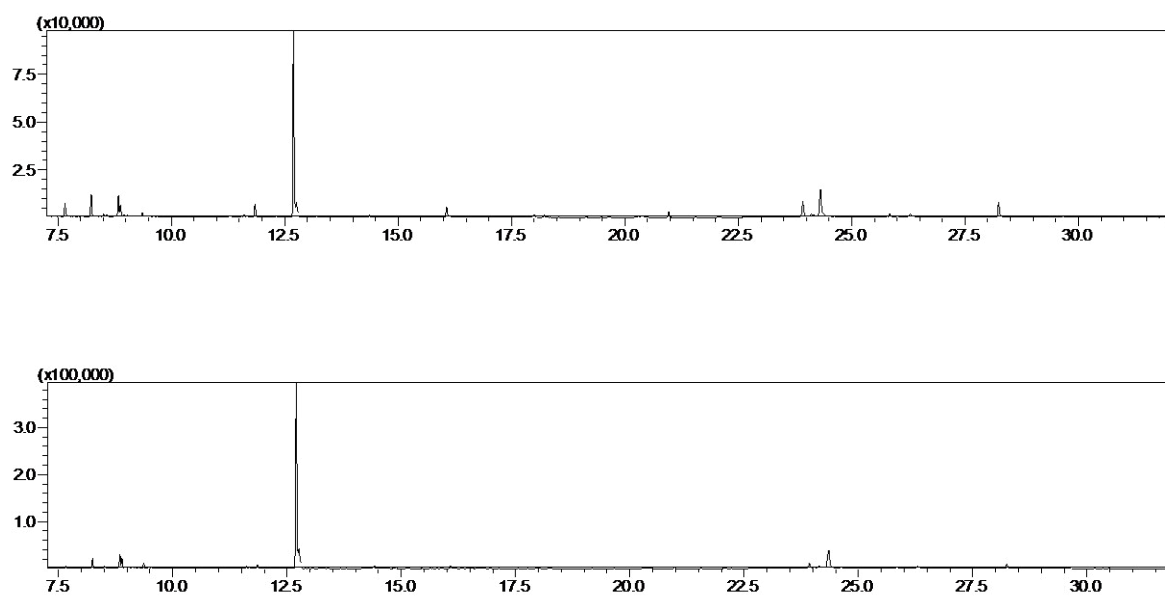


**Apêndice D:** Cromatogramas das amostras de hepatopâncreas dos caranguejos-  
uçá dos mangues de Sergipe.

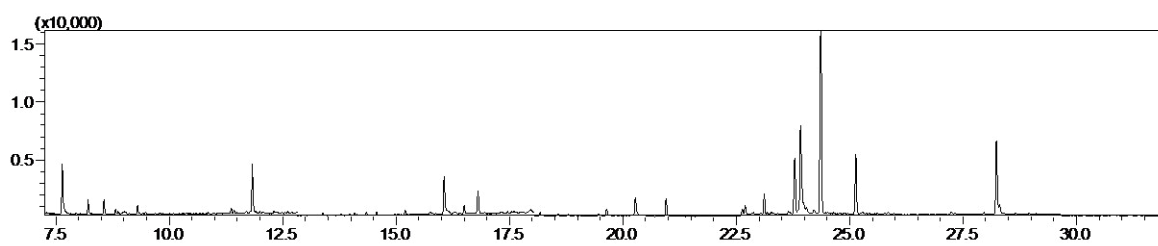
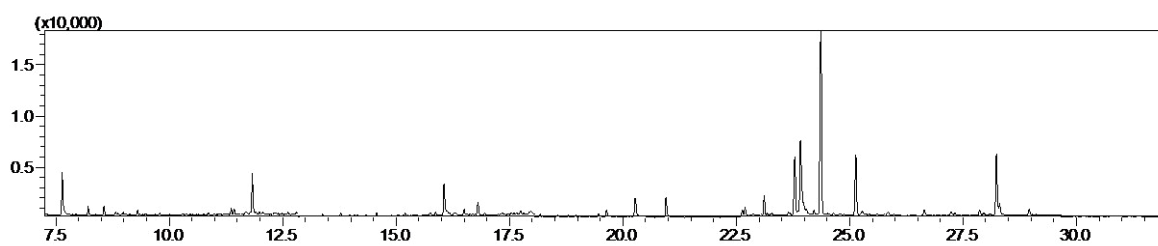
- Gameleiro



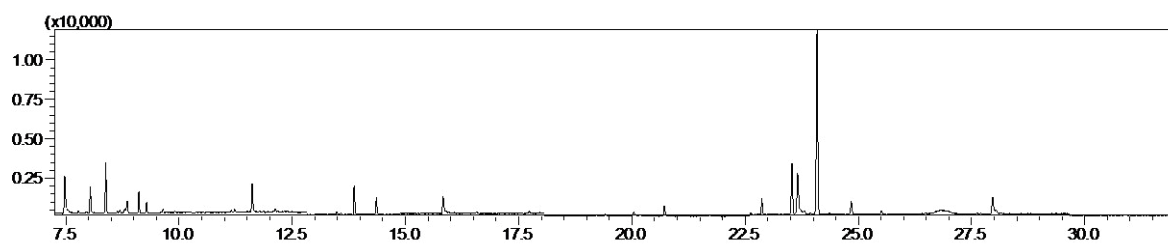
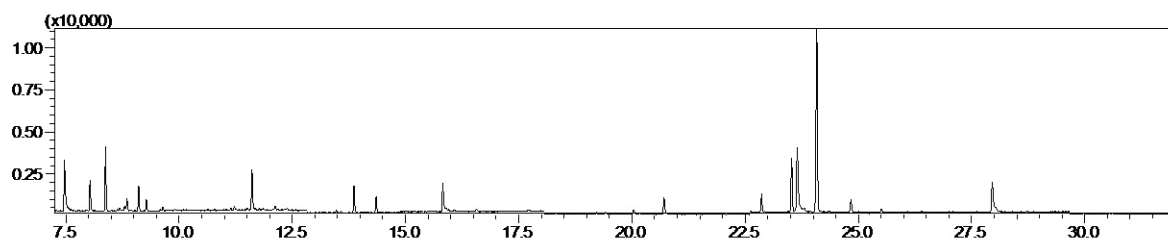
- Vaza-Barris



- Poxim

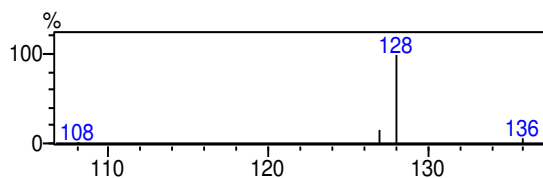


- Sergipe

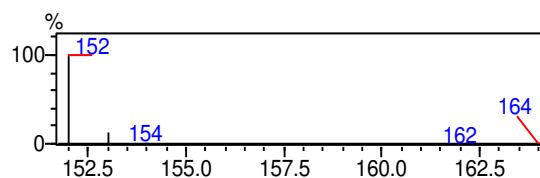


**Apêndice E:** Espectros de massa dos 16 HPA com seus respectivos íons de quantificação e identificação .

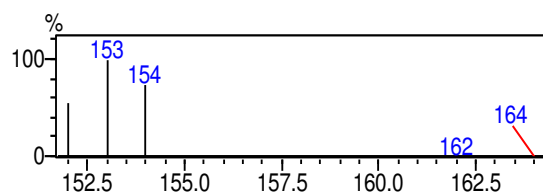
Naftaleno



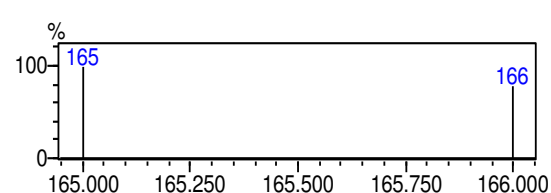
Acenaftileno



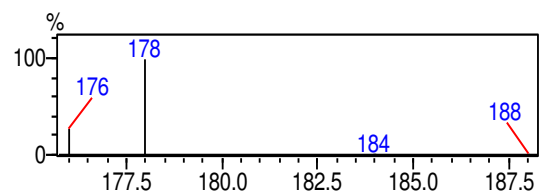
Acenafteno



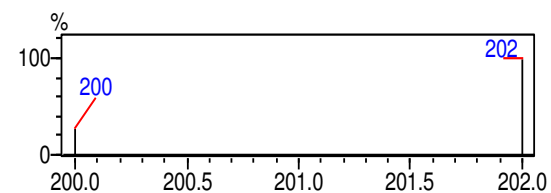
Fluoreno



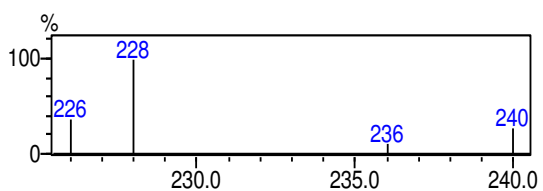
Fenantreno e Antraceno



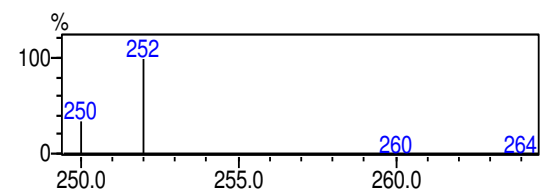
Fluoreno e Pireno



Benzo[a]antraceno e criseno



Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno e Benzo[a]pireno



Indeno[1,2,3-cd]pireno e Benzo[g,h,i]perileno

Dibenzo[a,h]antraceno

